



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

## **Expresión y cuantificación de ROR $\gamma$ t e IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*)**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

### **AUTOR**

**Gustavo Augusto MURGA ARAPA**

### **ASESOR**

**Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN**

**Lima, Perú**

**2017**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Murga G. Expresión y cuantificación de ROR $\gamma$ t e IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.

---



361.  
2-10(12)  
276

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **viernes 17 de noviembre del 2017**, a las **12:00 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0221-EPMV/FMV-2017, integrado por los siguientes profesores:

Hermelinda Rivera Gerónimo  
Alberto Manchego Sayán  
Victor Leyva Vallejos  
Lenin Maturrano Hernández

Presidente del Jurado  
Asesor de la Tesis  
Miembro del Jurado  
Miembro del Jurado

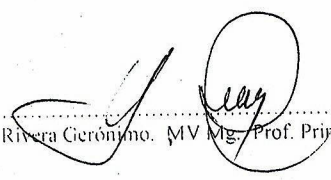
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **MURGA ARAPA, Gustavo Augusto** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:


### “EXPRESIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ROR $\gamma$ T E IL-17 EN MUCOSA INTESTINAL DE CRÍAS DE ALPACA (*Vicugna pacos*)”

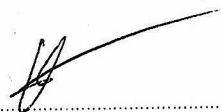
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

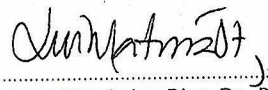
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:15 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

  
Hermelinda Rivera Gerónimo. MV Mg. Prof. Principal DE

  
Alberto Manchego Sayán, MV Mg. Prof. Principal, D.E.

  
Victor Leyva Vallejos. MV Dr. Prof. Principal D.E.

  
Lenin Maturrano Hernández, Blgo. Dr. Prof. Asociado T.C.

## **DEDICATORIA**

A mi familia por su inmenso  
apoyo y amor incondicional  
a lo largo de mi carrera profesional

A los selectos amigos de mi promoción  
Por haberme apoyado académica y amicalmente

A mis amigos del Club de Tenis de Mesa de la facultad  
Por haberme ayudado a lidiar con el estrés de la carga académica

A las personas especiales que conocí en estos 6  
años, lo que verdaderamente importa se queda muy  
profundamente en el alma

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alfonso Chavera Castillo  
y al Dr. Omar Gonzales Viera  
por guiarme en el camino del estudio  
de la anatomopatología y fortalecer mi pasión  
y curiosidad por está, reafirmandola día a día

Al Dr. Alberto Manchego, por  
darme la oportunidad de realizar  
este proyecto y brindarme  
su apoyo en todo momento

A INNOVATE Perú por financiar la tesis  
dentro del proyecto N° 180-FINCYT-IB-2013

A Gina Castro, Cesar Burga, Miguel  
Rojas por su paciencia, consejos y apoyo a  
largo de esta tesis

## ÍNDICE GENERAL

Pág.		
	DEDICATORIA	II
	AGRADECIMIENTOS	III
	ÍNDICE GENERAL	IV
	RESUMEN	VI
	ABSTRACT	VII
	LISTA DE FIGURAS	VIII
	LISTA DE CUADROS	IX
	LISTA DE ANEXOS	IX
	ABREVIATURAS	X
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Camélidos sudamericanos.....	3
2.2	La alpaca.....	3
2.3.	Importancia económica.....	4
2.4.	Aspectos Sanitarios e inmunes en camélidos.....	5
2.5.	Inmunidad en mucosa intestinal.....	11
2.6.	ROR $\gamma$ T.....	15
2.7.	IL-17.....	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1	Procedencia y procesamiento de la muestra.....	29
3.2	Extracción de ARN total.....	30
3.3	Síntesis de ADNc (Transcripción reversa).....	31
3.4	PCR Tiempo Real.....	32
3.5	Análisis de expresión de genes.....	34
3.6	Análisis estadístico.....	35

IV.	RESULTADOS .....	36
4.1	Expresión de GAPDH.....	36
4.2	Expresión de ROR $\gamma$ t.....	37
4.3	Expresión de IL-17.....	39
V.	DISCUSIÓN.....	42
VI.	CONCLUSIONES.....	48
VII.	SUGERENCIAS.....	49
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	50
IX.	ANEXOS.....	70



## RESUMEN

Diversos estudios han evaluado la expresión de citoquinas en células de la mucosa intestinal en animales y humanos, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Estudios previos realizaron la clonación, secuenciación y cuantificación de citoquinas pro inflamatorias de llama (*Lama pacos*) en células mononucleares de sangre periférica; sin embargo, aún falta una amplia gama de citoquinas por estudiarse en la alpaca, que jugarían un rol central en la homeostasis y sistema inmune de los camélidos sudamericanos. El objetivo del estudio fue caracterizar la expresión de ROR $\gamma$ t e IL-17, el regulador maestro y la citoquina clave, en el proceso de diferenciación celular del linaje de células TH17 así como de la regulación de la homeostasis intestinal frente al desafío de agentes patógenos, en mucosa intestinal del yeyuno de 17 crías de alpaca recién nacidas a 47 días de edad provenientes del distrito de Maranganí, Cusco. Se extrajo el ARN total de las muestras y se procedió a la transcripción reversa para obtener las cadenas complementarias de ADN (ADNc). Posteriormente se realizó la técnica de PCR convencional y PCR-RT tiempo real para evaluar la expresión de ARNm de IL-17 y ROR $\gamma$ t mediante la técnica de cuantificación relativa según el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  empleando el gen GAPDH como gen interno y en relación a animales calibradores recién nacidos que no han consumido calostro. Se detectó la expresión de IL-17 y ROR $\gamma$ t desde el nacimiento hasta los 45 días evaluados, siendo mayor la expresión de IL17 en comparación con el factor transcripcional ROR $\gamma$ t. Se observó una cinética ascendente y gradual de ambos, que alcanzó su máxima expresión entre la tercera y quinta semana de edad. De los resultados se concluye que en la mucosa intestinal de las crías de alpacas se expresan los genes que dirigen la respuesta inflamatoria y que estas se incrementan con la edad.

**Palabras claves:** RT-PCR Tiempo Real, IL-17, ROR $\gamma$ t, intestino, alpaca.

## ABSTRACT

Diverse studies have evaluated the expression of cytokines in cells of the intestinal mucosa in animals and humans in *in vitro* and *in vivo* models. Previous studies have made the cloning, sequencing and quantification of pro-inflammatory cytokines of the llama (*Lama pacos*) in mononuclear cells of peripheral blood; however, there is still a broad range of cytokines left to be studied in the alpaca, that would play a central role in the homeostasis and immune system of South American camelids.

The aim of the study was to characterize the expression of ROR $\gamma$ t and IL-17, the master regulator and a key cytokine respectively, in the process of T<sub>H</sub>17 cells lineage differentiation and regulation of the intestinal homeostasis against pathogen agents challenge, in the intestinal mucosa of newborn alpacas of 0 to 47 days of age from the district of Maranganí, Cusco. The RNA was extracted from the samples and the reverse transcription was performed to obtain the DNA complementary chains (cDNA). Posteriorly the conventional PCR and RT-PCR was performed. The mRNA of IL-17 and ROR $\gamma$ t expression was measured with the relative quantification test according to the 2<sup>-</sup>

C<sub>t</sub> method using the GAPDH gene as intern gene and with relation to the calibrator animals right after birth which had not consumed any calostrum. The expression of IL-17 and ROR $\gamma$ t were detected since birth to the 47 days evaluated being the expression of IL-17 greater than the transcriptional factor ROR $\gamma$ t. A gradual and ascendant kinetic was observed in both, that gradually reached their highest expression between the third and fifth week of age. From the results it was concluded that these genes that drive the inflammatory response are expressed in the intestinal mucosa of newborn alpacas and that these increase as the animal ages.

**Key words:** RT-PCR, IL-17, ROR $\gamma$ t, intestines, alpaca.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> La molécula ROR $\gamma$ t.....	17
<b>Figura 2.</b> Las células ROR $\gamma$ t positivas.....	20
<b>Figura 3.</b> Ilustración esquemática de la ruta de señalización que involucra a IL-17A en las enfermedades inflamatorias .....	27
<b>Figura 4.</b> Esquema explicando la representación de la lectura del software Applied Biosystem 7500 v2.0.1.....	34
<b>Figura 5.</b> Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.....	37
<b>Figura 6.</b> Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.....	37
<b>Figura 7.</b> Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para ROR $\gamma$ t en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.....	38
<b>Figura 8.</b> Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen ROR $\gamma$ t en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.....	38
<b>Figura 9.</b> Niveles de expresión de ROR $\gamma$ t en mucosa intestinal de crías de alpacas según los grupos etarios con respecto al calibrador.....	39
<b>Figura 10.</b> Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.....	40
<b>Figura 11.</b> Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.....	40
<b>Figura 12.</b> Niveles de expresión de IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpaca según los grupos etarios con respecto al calibrador.....	41

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Características de los grupos etarios asignados en el estudio.....	29
<b>Cuadro 2.</b> Oligonucleótidos empleados para la técnica RT-PCR Tiempo Real de las citoquinas ROR $\gamma$ t, IL-17 y GAPDH.....	32

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Cuadro A1.</b> Cuantificación de ARN total .....	70
<b>Cuadro A2.</b> Valores promedio de Ct de ROR $\gamma$ T, GAPDH, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , varianza, desviación estándar y coeficiente de variación hallados en animales sanos.....	71
<b>Cuadro A3.</b> Valores promedio de Ct de IL-17A, GAPDH, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , varianza, desviación estándar y coeficiente de variación hallados en animales sanos.....	72
<b>Figura A5.</b> Resultados software STATA 14: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para ROR $\gamma$ T en los diferentes grupos etarios.....	73
<b>Figura A6.</b> Resultados software STATA 14: Prueba de Shapiro wilk, Kruskal Wallis y U de Mann - Whitney para IL-17 en los diferentes grupos etarios.....	76

## ABREVIATURAS

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
Ahr: Receptor arilhidrocarbon  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
CCR: Receptor de quimiocina  
CD: Cluster of differentiation  
CSA: Camélidos sudamericanos  
Ct: Ciclo umbral o ciclo threshold  
CXCL: Ligando de quimiocina  
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
Foxp3: Factor de transcripción de la caja P3 del dominio “forkhead”  
GALT: Tejido linfoide asociado a intestino  
GAPDH: Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa  
GATA3: Factor de transcripción de la proteína GATA-3  
GFP: Proteína fluorescente verde  
GM-CSF: Factor estimulante de colonia granulocítica-monocítica  
IFN- $\gamma$ : Interferón gamma  
Ig: Inmunoglobulina  
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible  
IL: Interleuquina  
ILC: Célula linfoide innata  
LPDC: Células dendríticas de la lámina propia  
LPS: Lipopolisacárido  
LTi: Células inductoras de tejido linfoide fetal  
MALT: Tejido linfoide asociado a mucosa  
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad  
MCP-1: Proteína-1 quimiotáctica de monocitos  
Myd88: Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88  
Nfil3: Factor transcripcional codificado por NFIL3 (Factor nuclear regulado por IL3)  
NK: Células asesinas naturales o natural killer  
NKp46: Receptor para células NK  
qRT-PCR: Transcripción reversa cuantitativa – reacción en cadena de la polimerasa  
ROR $\gamma$ t/ $\alpha$ : Receptor del ácido retinoico asociado al receptor huérfano gamma t/alfa  
RZR: Receptor retinoide Z  
STAT3: Señal transductor y activadora de transcripción 3  
SEFIR: SEF (Expresión similar a genes de factor de crecimiento fibroblástico) y dominio IL-17R  
SEFEX: Extensión corta C terminal SEF  
T-bet: Factor de transcripción de la caja T  
Th: Linfocito t helper o t colaborador  
TCR: Receptor de células T  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta  
TLR: Receptor tipo toll  
Tm: Temperatura de disociación  
TRANCE: Citoquina inducida por la activación relacionada a TNF  
TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
Treg: Linfocito t regulatorio  
VHH: Dominio variable simple

## I. INTRODUCCIÓN

La crianza de alpacas tiene importancia debido al ingreso económico por la venta de carne, fibra, reproductores y al uso racional de recursos naturales y porque de esta actividad depende directamente de 350 000 familias campesinas en zonas altoandinas (INEI, 2012), siendo esta crianza el principal medio de subsistencia de las comunidades de altiplano andino, resaltando la crianza de alpacas la cual se realiza de manera deficiente desde el punto de vista técnico y sanitario (Bustinza, 2000).

El sistema inmune mucosal posee tres funciones principales: proteger las membranas mucosas contra la colonización e invasión por agentes potencialmente peligrosos, prevenir la ingesta de antígenos sin degradar incluyendo proteínas extrañas derivadas de la ingesta de alimento, materia aerógena y microorganismos comensales y así también para prevenir el desarrollo de respuestas inmunes potencialmente perjudiciales a estos antígenos (Holmgren y Czerkinsky, 2005).

Son escasos los estudios sobre las citoquinas proinflamatorias y reguladoras que participan en la inmunidad mucosal intestinal, habiéndose estudiado la cinética de expresión *in vitro* de algunas interleuquinas de alpacas en los últimos años, especialmente de la respuesta inmune innata (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Bardález *et al*, 2013; Tambillo *et al*, 2013) y adaptativa (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10) (Chiok, 2012).

ROR $\gamma$ T fue encontrado en ratones “knock-in” en células inductoras de tejido linfóide fetal (Eberl *et al*, 2004) y posteriormente en células Th17 (Ivanov *et al*, 2006). A su vez, IL-17 fue denominado anteriormente CTLA-8 (Proteína 8 asociada a linfocito T citotóxico de ratón), actualmente su terminología cambió siendo el CTLA-8 del ratón denominado ahora IL-17 y su receptor IL-17R (Chu, 2017).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la expresión *in vitro* de IL-17 y ROR $\gamma$ t en mucosa intestinal de crías de alpaca clínicamente sanas, estableciendo la cinética de producción de los ARNm de estas dos citoquinas y, de esta manera, cuantificar y brindar una aproximación al comportamiento *in vivo* de la cantidad de secreción de estas citoquinas en las crías de alpacas en diferentes grupos etarios, fundamentado en la función de IL-17 y la caja de transcripción ROR $\gamma$ T en regular la inmunidad en la mucosa intestinal (Gaffen *et al*, 2014)

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

De acuerdo a los registros fósiles el proceso de domesticación de los camélidos sudamericanos empezó hace 4000 a 5000 años atrás en los Andes. Un remarcable aumento en la población ocurrió durante este período, sugiriendo el establecimiento predominantemente de una economía de crianza (Tynes, 2010).

Aunque se creía que los Andes central del Perú fue la tierra de origen de la domesticación de los camélidos, investigaciones recientes indican que similares desarrollos ocurrieron en paralelo en la región de los Andes del Sur-Central hacia el sur del Perú, el norte de Chile y el noroeste de Argentina (Tynes, 2010).

Los camélidos están actualmente representados en Asia y África, así como en Sudamérica (Nowak, 1991). Existen dos tribus de camélidos habitando las zonas desérticas de Asia y África más conocidas como Camélidos del Viejo Mundo o *Camelini*, por otro lado, la tribu *Lamini* habita en América del Sur a lo largo de la Cordillera del Viejo Mundo. Cuatro especies de camélidos habitan en Sudamérica actualmente, dos de ellas silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*) (Müller, 1776) y la vicuña (*Vicugna vicugna*, Molina 1782).

### 2.2 LA ALPACA

La alpaca es similar en apariencia al guanaco y a la llama, pero significativamente más pequeña con alrededor de 55 a 65 kg, con longitud de pelo de hasta 500 mm de largo. La alpaca fue aparentemente domesticada en Perú miles de años atrás, siendo criada selectivamente por su fina lana, la cual posee gran valor comercial (Nowak, 1991).



Estudios a través de ADN mitocondrial y microsatélites sugieren la descendencia de las alpacas (*Vicugna pacos*) a partir de las vicuñas (*Vicugna vicugna*). Tanto el guanaco como la vicuña parecen haber descendido de un ancestro común y sufrieron divergencia hace 2 millones de años; por su parte, las alpacas pudieron haberse separado de las vicuñas hace unos 6 o 7 mil años (Kadwell *et al*, 2001; Marín *et al*, 2007).

### **2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA**

Se estima que al año 2000, al menos un millón y medio de personas de las zonas alto andinas de los departamentos de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno, se dedicaban a la crianza de CSA domésticos como actividad principal. Los ingresos per cápita en estas zonas productoras de camélidos son los menores del país (FAO, 2005).

La crianza de esta especie tiene una importancia económica real debido no sólo por la producción de fibra, sino también por su carne, valiosa fuente de proteínas al alcance de los campesinos; aparte de la producción de cueros y pieles de las que se derivan ciertas actividades artesanales. El sistema de crianza exclusivamente extensivo y en zonas sobre los 4200 msnm., donde no es posible la agricultura ni la crianza rentable de otras especies de animales domésticos (Ameghino y De Martini, 1991).

Actualmente, aunque la crianza de llamas y alpacas sea un elemento central en la economía de los Andes altos, muchas veces no es rentable debido a la pobre calidad de los animales y de su fibra (Kadwell *et al*, 2001).

La mortalidad en crías de alpacas constituye una de las mayores causas de pérdidas económicas en la producción de esta especie y causa una seria limitación técnica y económica, tanto para los trabajos de selección, así como para los reemplazos trayendo un retraso en el crecimiento de población alpaca. También significa pérdidas directas que inciden en la producción de fibra, carne y subproductos, así como también, pérdidas de divisas para el país por la fibra que se deja de producir. Es por eso que cada esfuerzo económico-práctico deberá ser dirigido para minimizar dichas pérdidas, y no cause una

descapitalización y desaliento como para que la ganadería alpaca deje de ser una actividad rentable (Ameghino y De Martini, 1991).

## **2.4. ASPECTOS SANITARIOS E INMUNES EN CAMÉLIDOS**

El ambiente en donde se desarrolla la producción de camélidos sudamericanos carece de muchos recursos económicos y sociales para el desempeño efectivo de esta crianza. Las restricciones, tales como el desconocimiento y pobre aplicación de las técnicas sanitarias, ausencia de especialistas, y principalmente factor económico que limita cubrir los costos de prestación de servicio y medicación (Crispin, 2008).

Las especies domésticas de Camélidos Sudamericanos (CSA) presentan las mayores tasas de morbilidad y mortalidad en edad de cría (Martín, 2010), incluyendo este período la mortalidad perinatal (0-7 días de edad), la mortalidad neonatal (hasta los 30 días de edad) y la mortalidad de crías mayores de un mes hasta el destete (hasta los 6 a 8 meses de edad) (Rosadio, 2010). Ameghino y De Martini (1991), realizaron un estudio en los departamentos de Puno y Junín, evidenciando que las muertes se concentran en la etapa neonatal, siendo críticos los primeros 30 días de edad.

Los camélidos poseen una placenta epiteliocorial, así como en los terneros y potrillos, reciben la protección pasiva contra las enfermedades a través de la reabsorción intestinal de inmunoglobulinas del calostro después del nacimiento (Wernery y Kaaden, 2002).

Aunque los terneros recién nacidos son inmunocompetentes, la producción endógena de anticuerpos no es suficiente para producir niveles de inmunoglobulinas protectivos dentro del primer mes de vida. La fracción de globulina es naturalmente baja al nacimiento. Incluso después de la ingestión de calostro, el nivel de globulina disminuye después del 7mo día y alcanza el nivel más bajo entre los días 20 y 30 post parto ocurriendo durante este tiempo la más alta tasa de pérdidas por enterotoxemia por *Clostridium perfringens* (Wernery y Kaaden, 2002).

Los principales factores de riesgo asociados con los agentes infecciosos incluyen factores de virulencia, tamaño de inóculo o carga patógena y presencia de una o múltiples infecciones. Los principios básicos para la inmunización de los camélidos contra

organismos tales como *Clostridium perfringens* tipo C y D y toxoides de *C. tetani*. Una vacuna de virus muerto de rabia y una bacterina de leptospirosis podrían ser usadas si es que existe enfermedad endémica (Cebra *et al*, 2014).

Brucelosis, tuberculosis, enfermedad de Johne (paratuberculosis) han sido identificadas en los camélidos sudamericanos, aunque la incidencia ocuriente natural de estas infecciones es baja (Johnson, 2016).

La enterotoxemia es la principal causa de mortalidad neonatal en el sur del Perú (Ameghino y De Martini *et al*, 1991). Históricamente, *Clostridium perfringens* tipo A y C han sido considerados como agentes desencadenantes del proceso infeccioso. El complejo enterotoxemia no es producto de una infección única pudiendo ser consecuencia de interacciones patológicas de exotoxinas clostridiales con infecciones primarias de parásitos intracelulares (*Eimeria* spp.) o virus enteropatógenicos (Ejemplo: Rotavirus, coronavirus) (Rosadio *et al*, 2012).

La mortalidad en estos animales afectados varía entre 10 y 70% incluso en lugares con cuidados intensivos puede alcanzar el 50%. Esta enfermedad ocurre en los 8 y 35 días de edad con muerte súbita o un corto período de enfermedad durante la cual las crías muestran recumbencia y alteraciones del sistema nervioso. Los cambios patológicos en las alpacas son similares a las lesiones vista en los camélidos de viejo mundo, animales con abdomen hinchado por la presencia de gas en los intestinos, inflamación de las placas de Peyer, ganglios mesentéricos aumentados de tamaño, congestionados o hemorrágicos, la mucosa del estómago glandular puede estar congestionada o hemorrágica. El hígado congestionado y a veces amarillento, signo de degeneración grasa. Pulmones congestionados y edematosos, hiperemia, fluido pericárdico sero-sanguinolento excesivo (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998; Wernery y Kaaden, 2002).

En alpacas, dentro de las coccidias reportadas existen las especies: *Eimeria alpaca*, *E. lamae* y *E. punoensis* (infectando el epitelio intestinal), *Eimeria macusaniensis* (afecta las criptas intestinales) y *E. ivitaensis* cuya patogenicidad aún es desconocida, aunque se encuentra restringida al yeyuno e íleon (Palacios *et al*, 2006). La presencia de *Eimeria macusaniensis* en animales muertos por enterotoxemia o por diarrea ha sido reportada (Rosadio y Ameghino, 1994). En el 30.6% de muestras intestinales de animales con

enterotoxemia se demostró coexistencia de una masiva presencia de *Eimeria macusaniensis*, sugiriendo que las infecciones coccidiales podrían ser un factor facilitador de la multiplicación clostridial o de la excesiva producción de toxinas necesarias para generar la enfermedad. Asimismo, en todas estas muestras se aisló *Clostridium perfringens* tipo A (Rosadio *et al*, 2010).

El *Clostridium perfringens* tipo A es un patógeno muy importante bajo condiciones estresantes, especialmente en Sudamérica, y resulta en altas tasas de mortalidad de crías menores a 4 semanas de edad. Las cepas enterotoxigénicas de *C. perfringens* tipo A son particularmente letales. Los signos clínicos son similares a aquellos de infecciones por las del tipo A en otras especies, con un rápido desarrollo de cambios neurológicos seguido rápidamente por la muerte (Johnson, 2016).

Investigaciones durante los últimos cinco años corroboran la información acerca de los tipos de *Clostridium perfringens* en nuestro medio, encontrándose que el 99.6% de 224 aislados de casos fatales de la enfermedad correspondían a *Clostridium perfringens* tipo A y el diferencial al tipo C. En esos estudios, el 91.1% de las cepas tipo A poseían únicamente el gen *cpa* codificante de la exotoxina  $\alpha$ , mientras que los 19 restantes (8.5%) tenían, además, la enterotoxina secundaria  $\beta_2$  (Pérez, 2006; Rosadio *et al*, 2008), pero ninguna contenía el gen *cpe* codificante de la enterotoxina, toxina sugerida en el pasado de ser responsable de la enterotoxemia (Ramírez, 1991).

Las infecciones por *E. coli* son importantes en los camélidos del nuevo mundo y ocurren principalmente en crías malnutridas. La colisepticemia neonatal es una enfermedad seria caracterizada por fiebre, debilidad, metritis, mastitis y formación de abscesos. Los animales afectados sufren de diarrea profusa amarillenta, pérdida de peso y distensión abdominal (Wernery y Kaaden, 2002).

En la región de Santa Rita, Ciudad Lircay, Provincia Angares del Departamento de Huancavelica, Perú, se evaluaron cepas potencialmente patógenas en muestras fecales de alpacas neonatas y niños dedicados a su crianza evaluando, en 7 familias, la presencia de tres patotipos de *E. coli* (Enterotoxigénico o ECET, Enterohemorrágica o EHEC, Enteropatógena o EPEC). Para lo cual se analizaron muestras de heces no diarreicas en 72 alpacas neonatas y 12 niños. Al análisis de las 72 alpacas neonatas muestreadas, 40

animales presentaron al menos un patotipo de *E. coli*. De 7/40 animales se aislaron cepas EHEC, 4 de estos 7 animales fueron cepas EHEC y de los restantes 3 se aislaron combinaciones de cepas EHEC y EPEC típicas y atípicas. En 3 de las 7 familias se detectaron 4 niños positivos a algún patotipo de *E. coli*. (Rímac, 2015). Las cepas EPEC serían potencialmente productoras de diarrea recurrentes a través del gen *eae*, *bpf*, o ambos factores de virulencia identificados, mientras que las EHEC serían causantes de infecciones fatales (Luna *et al*, 2012).

Con la excepción del complejo viruela del camello, una gran carencia de información existe con respecto a las enfermedades virales en los camélidos. Aunque todas las especies de camélidos poseen múltiples similitudes anatómicas y fisiológicas, se cree que estas no difieren en su susceptibilidad a los virus, la comparación de los camélidos del nuevo mundo con los del viejo mundo es importante para indicar cualquier susceptibilidad familiar posible. Solo pocos virus parecen causar enfermedad en camélidos de los cuales se incluye: Virus de la rabia, viruela del camello, ectima contagioso, papilomatosis, influenza, rotavirus, herpesvirus equino, enfermedad de Borna (Wernery y Kaaden, 2002).

Se han detectado títulos de anticuerpos contra los virus de la diarrea viral bovina en camélidos del nuevo mundo criados con ganado bovino persistentemente infectado y después de un episodio de abortos por este virus en cabras pigmeas. Mientras que existe mención de aislados de VDVB (Virus de la diarrea viral bovina) en llamas asociado con abortos, descarga nasal excesiva o diarrea, no hay reportes de casos clínicos en camélidos del nuevo mundo o estado de ganado con VDVB (Belknap *et al*, 2000). Se detectó viremia y anticuerpos de respuesta específicos contra el VDVB en llamas infectadas, pero no se observaron signos de enfermedad. No se aislaron virus en crías o fetos abortados, aunque los anticuerpos fueron evidentes en crías después del consumo de calostro (Wentz *et al*, 2003). En USA se detectaron en 63 rebaños, 16 crías seropositivas y 4 rebaños con crías persistentemente infectadas fueron relacionadas con evidencia por homologías genéticas de virus. En suma, a las crías persistentemente infectadas, la alimentación suplementaria de calostro fue asociada con la seropositividad del rebaño (Topliff *et al*, 2009).

En el 2008 una alpaca hembra de 15 años de edad en un rebaño en el norte de California murió después de un breve episodio de enfermedad caracterizada por aparición súbita de

debilidad, recumbencia y dificultad respiratoria. Al examen post mortem se reveló severo hidrotórax e hidropericardio, marcado edema pulmonar y hemorragia miocárdica superficial aguda afectado el ventrículo izquierdo. El virus de lengua azul fue detectado en el bazo por qRT-PCR y confirmado por análisis de secuenciamiento. No se detectaron anticuerpos contra este virus en el suero usando un ELISA competitivo, confirmando la infección aguda fulminante (Ortega *et al*, 2010).

Los coronavirus han sido asociados con diarrea en llamas y alpacas neonatales en el 64% de los rebaños en Estados Unidos (Cebra *et al*, 2003), y en el Perú se ha detectado en un 40% en crías con cuadros diarreicos en rebaños de la región altoandina del cusco (Rojas *et al*, 2016). Hay evidencia anecdótica que la diarrea asociada con coronavirus se está volviendo más común no solo en camélidos sudamericanos juveniles sino también en adultos. Los coronavirus del grupo 2 son causa importante de diarrea y enfermedad respiratoria en terneras y disentería de invierno en el ganado adulto (Smith, 2001). Se han detectado coronavirus en heces de alpacas adultas mediante RT-PCR. La presencia del coronavirus de alpaca (ApCoV) en el intestino delgado fue demostrado por inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal antinucleocápside que reacciona con los coronavirus del grupo 2. Otras causas comunes de diarrea en camélidos adultos no fueron detectadas (Genova *et al*, 2008).

En agosto de 2002, una alpaca hembra de 4.5 años desarrollo signos clínicos agudos caracterizados por torticollis, hiperestesia, ataxia, recumbencia, y alteraciones neurológicas. El animal murió 3.5 días después de iniciado los signos clínicos. Los exámenes histopatológicos revelaron en el cerebro leve a moderada meningoencefalitis linfoplasmocítica difusa. El RT-PCR y la inmunohistoquímica en el cerebro resultaron positivas para virus del oeste del Nilo en este animal (Yaeger *et al*, 2004).

En el camello y la llama, se ha usado los linfocitos circulantes y del bazo como fuente de ADNc anticuerpo-específico y por lo tanto uno puede asumir que la sangre y el bazo contienen células inmunocompetentes. La generación del repertorio de anticuerpos de cadena pesada es de particular interés. La variación de aminoácido entre los V<sub>HH</sub> diferentes analizados a la fecha es mucho mayor que dentro de los miembros del subgrupo V<sub>HHIII</sub> de otras especies (ratones u hombre). Esto podría sugerir un pool genético V<sub>HH</sub>

variado y grande o alternativamente un nivel elevado de maduración a través de mutación de conversión genética u otro mecanismo genético (Pastoret *et al*, 1998).

Las inmunoglobulinas de los camélidos difieren de todos los anticuerpos conocidos y contradicen todas las teorías comunes sobre la diversidad de anticuerpos. Fue demostrado que hasta el 75% de todas las proteínas del suero son inmunoglobulinas G (IgG) carentes de cadenas ligeras (Pastoret *et al*, 1998; Wernery, 2001).

IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>, las cuales solo se consisten de cadenas pesadas, poseen un bajo peso molecular el cual mejora la biodistribución y permite una mejor penetración al tejido. Es de especial importancia del bucle de la región determinante de complementariedad larga (CDR) el cual se inserta profundamente en el sitio activo de una enzima. Esta propiedad de unión fue solo observada en experimentos para obtener información estructural para resaltar el importante valor de anticuerpos de cadena pesada como herramientas farmacológicas y bioquímicas (Wernery, 2001).

La adquisición y absorción de cantidades adecuadas de inmunoglobulinas en el calostro es esencial para la salud del neonato. Niveles de IgG en el suero pre-calostro en camélidos son bajos, con concentraciones de 24.52% +/- 8.8 mg/dl. Los niveles de concentración por encima de 10 mg/ml indican una transferencia pasiva exitosa. Los niveles de IgG empiezan a declinar después de las 2-5 semanas y un marcado incremento es observado entre el 1er y 2do mes, indicando que el sistema inmune del neonato ha empezado a madurar (Wernery, 2001).

Sobre los camélidos sudamericanos, se ha clonado y secuenciado las citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL12p35 e IL12p40 obteniéndose cDNA de 501, 465, 669 y 993 pb de longitud con marcos de lectura abierto codificando 166, 154, 22 y 330 aminoácidos, respectivamente. El análisis filogenético revela relación cercana con las secuencias de mamífero del orden *Artiodactyla* como el cerdo y el bovino, de manera similar a lo encontrado en el camello bactriano (Odbileg *et al*, 2004).

Se utilizó RT-PCR para cada citoquina en condiciones específicas para amplificar cuatro tipos de citoquinas pro inflamatorias, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  mediante la inducción

de células mononucleares sanguíneas periféricas de llamas por LPS evidenciándose altos niveles de estos perfiles de citoquinas después de la estimulación (Odbileg *et al*, 2005).

## **2.5 INMUNIDAD DE MUCOSA INTESTINAL**

Las superficies mucosales más amplias (como la del intestino) están constantemente expuestas a millones de antígenos potencialmente perjudiciales del medio ambiente, alimento y bacterias. Para cumplir esta tarea, las superficies mucosas poseen un único sistema de defensa que controla el balance entre la responsividad y no responsividad (tolerancia) el cual consiste de una red de tejidos integrada, células linfoides y no linfoides y moléculas efectoras como los anticuerpos, quimioquinas y citoquinas para la protección del hospedero (Neurath *et al*, 2002).

El sistema inmune mucosal debe ser también capaz de inducir respuestas inmunes mediadas por anticuerpos y por células efectivamente hacia antígenos seleccionados. Dada la compleja y altamente interactiva naturaleza del MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosa) y sus diversas tareas, es claro que este sistema podría ser altamente sensitivo a las alteraciones causadas por antígenos bacterianos y otros patógenos; en particular en situaciones donde una predisposición genética exista (Neurath *et al*, 2002).

El GALT (Tejido linfoide asociado a intestino) es el término colectivo para todos los nódulos linfoides, placas de Peyer, y linfocitos individuales encontrados en las paredes intestinales. En los rumiantes, cerdos, caballos, perros y humanos (grupo I), 80 al 90% de las placas de Peyer son encontradas en el íleon, donde estas forman una estructura continua única que se extiende hacia la unión ileocecal. Las placas de Peyer del íleon consisten de folículos linfoides densamente empaquetados, cada uno separado por una lámina de tejido conectivo y contiene solo linfocitos B, estos folículos cumplen la función de rápido proliferación de células B similar a la Bursa de Fabricio en aves (Tizard, 2009).

Las placas de Peyer están localizadas entre las vellosidades y son una de las áreas primarias en el GALT en las cuales las respuestas inmunes específicas son generadas. El antígeno es tomado mediante células especializadas llamadas células M que cubren las placas de Peyer (Gonnella *et al*, 1998).



Una característica resaltante es la ausencia de drenaje linfático del intestino grueso aparentemente compensado por un extensivo desarrollo de las placas de Peyer de las cual se han enumerado más de 700 (Pastoret *et al*, 1998).

El intestino del mamífero es hogar a un abundante y complejo consorcio de bacterias que orquestan importantes funciones inmunes y metabólicas en el hospedero. La composición de esta microbiota, así como la localización espacial de las bacterias en el intestino dicta el balance de tolerancia versus las respuestas pro inflamatorias en el intestino (Chu y Mazmanian, 2013).

El 90% de bacterias comensales de un organismo reside en los intestinos. Las bacterias comensales intestinales pueden proveer beneficios al hospedero, incluyendo la ruptura de polisacáridos vegetales indigeribles, proveer de energía para las células epiteliales colonicas, y como barrera contra bacterias patogénicas invasivas. En suma, la microbiota intestinal orchestra la maduración postnatal de las defensas inmunológicas del intestino, las cuales, a su vez, preservan la homeostasis intestinal y la integridad del hospedero (Backhed *et al*, 2005).

Es posible que distintos miembros de la microbiota comensal activen componentes específicos del sistema inmune de manera tal que participen en la regulación de la homeostasis inmune intestinal (Macpherson y Harris, 2004; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

Los enterocitos están involucrados en la regulación de los eventos de inflamación local, habiéndose observado en ratones deficientes de IL-2 el aumento de expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 después de iniciarse eventos de colitis. Estas células pueden presentar antígenos a través del MHC-II y secretar activamente las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6 y la proteína atrayente de monocitos o MCP-1, citoquinas marcadoras de inflamación inespecífica (Meijssen *et al*, 1998).

El LPS de la pared bacteriana de las gram negativas es un componente común a muchas bacterias y funciona como un potente estímulo local para la producción de estas citoquinas e IL-8. Sin embargo, los ratones normales no expresan niveles detectables de estos transcritos, los que son detectables sólo en ratones mayores de 24 semanas de edad con colitis (Meijssen *et al*, 1998).

Las células presentadoras de antígeno mucosales son derivadas de monocitos precursores únicos de sangre, están localizados en la lámina propia, las placas de Peyer y los linfonódulos mesentéricos (Varol, *et al* 2007; Fogg *et al*, 2006; Geissmann *et al*, 2003), y están entre las primeras células de detección y respuesta de flora bacteriana endógena (Mowat, 2003). Las células dendríticas en las placas de Peyer pueden tomar y procesar bacterias vivas y antígenos solubles obtenidos oralmente (Kelsall y Strober, 1996), y un subgrupo de estas células dendríticas expresan el receptor de quimiocina CCR6 y pueden estimular células T específicas de patógenos (Salazar-Gonzalez *et al*, 2006).

Se ha identificado un subgrupo de células dendríticas de la lámina propia CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> (LPDCs) que expresaron TLR5 en el intestino delgado. Al ser estimulado por flagelina ligando de TLR5, las LPDCs TLR5<sup>+</sup> indujeron la diferenciación de células B primogénitas en células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A mediante un mecanismo independiente de tejido linfoide asociado a intestino. En suma, mediante un mecanismo dependiente de estimulación de TLR5, estas LPDCs promovieron la diferenciación de células T helper productoras de IL-17 antígeno específicas y células T-helper 1 (Uematsu *et al*, 2008).

La administración oral de LPS y ácido lipoteicoico corrige la predisposición a colitis, revelando que los ligandos TLR poseen efectos beneficiosos en el hospedero (Rakoff-Nahoum *et al*, 2004). Ya que DSS (sulfato sódico dextrano) induce el daño intestinal, estos hallazgos sugieren que la señalización por TLR por la microbiota conlleva al mantenimiento de la homeostasis epitelial intestinal en ausencia de patógenos entéricos (Chu y Mazmanian, 2013).

Un subgrupo de células T expresa TLRs funcionales (Manicassamy y Pulendran, 2009). La transferencia de células deficientes en MyD88 en ratones deficientes de RAG resultó en menos inflamación intestinal (Fukata *et al*, 2008). Opuestamente, mientras que la señalización de TLR por las células T era clásicamente pensada en promover la inmunidad, ahora parece que este proceso puede restringir respuestas inflamatorias. Por ejemplo, el tratamiento de células T CD4<sup>+</sup> con un agonista de TLR4 incrementa la actividad supresora y mejora la protección contra la colitis (Caramalho *et al*, 2003). Por lo tanto, los TLRs representan un sistema de señalización dinámico que activa varios resultados inmunológicos, y la señalización de TLR directamente por las células inmunes

adaptativas regula las reacciones en la ausencia de células inmunes innatas (Komai-Koma *et al*, 2004; Liu *et al*, 2006; Suttmüller *et al*, 2006).

Varios estudios han sugerido que una respuesta específica de citoquinas frente a determinado patógeno no es necesariamente la mejor vía para la resolución de la infección causada por otro patógeno, llevando a duración prolongada del cuadro. Esto se debe a que los distintos factores de virulencia y patogenicidad estimulan respuestas inmunes diferentes y por ende tienen resolución distinta (Long *et al*, 2010).

Se ha demostrado que niveles altos de TNF- $\alpha$  e IL-6 se asocian a duración disminuida de los cuadros diarreicos causados por cepas de *E. coli* tipo EPEC (enteropatógenicas), probablemente debido a que ambas citoquinas activan mecanismos efectores a nivel de epitelio intestinal. Por otro lado, el aumento de IL-8 tiende a causar daño extremo en el tejido intestinal tras promover la migración de neutrófilos. Asimismo, los niveles elevados de IL-4 y no de IFN- $\gamma$  ayudan a eliminar la infección por EPEC, demostrando que la respuesta Th1 no puede por sí misma erradicar las infecciones entéricas. Es de remarcar que muchos mecanismos de evasión de patotipos de *E. coli* se valen de regular negativamente la expresión de citoquinas (Long *et al*, 2010).

Se ha caracterizado la respuesta inmune adaptativa celular (Th1) y humoral (Th2) en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas con enteropatía de cero a 45 días de edad evaluándose la expresión de ARNm de IFN $\gamma$  e IL-2 (Th1) junto a IL-4 e IL-10 (Th2) a través de RT-PCR Tiempo Real y cuantificación relativa según el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  empleando el gen GAPDH como gen interno y en relación a animales calibradores recién nacidos que no han consumido calostro. Se encontró que la expresión de estas citoquinas es detectable a partir del nacimiento y que poseen una cinética ascendente y gradual que alcanza su máxima expresión entre la tercera y quinta semanas de edad en todas las citoquinas evaluadas en el grupo de animales sanos (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10) (Chiok, 2012). La expresión de IgA se muestra elevada en yeyuno de alpacas al transcurrir las semanas (Dionisio *et al*, 2014), mostrando que a pesar de existir un predominio Th1, la expresión de inmunoglobulinas no se ve afectada. Esto también se confirma por Reyes en el 2015 al analizar la expresión de IgA en mucosa yeyunal de alpacas clínicamente sanas hasta los 56 días de edad, mostrando una expresión ascendente al aumentar la edad, a pesar de existir un predominio Th1.

Otros estudios muestran como la respuesta inmune de las alpacas se ve influenciada al ser estimulados con antígenos clostridiales. Watanabe *et al* (2014) encontró que en los leucocitos sanguíneos de alpacas una elevada expresión de IL-10 con respecto a IL-2 frente a la presencia de antígenos clostridiales.

Se encontró una elevada expresión de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-2 frente a antígenos clostridiales y ácido retinoico en leucocitos sanguíneos de alpaca; sin embargo, IL-4 e IL-10 no mostraron diferencias en su expresión (More, 2013).

## 2.6 ROR $\gamma$ t

Dos líneas de investigación independientes llevaron al descubrimiento de ROR $\gamma$  y a su isoforma corta ROR $\gamma$ t. En la primera línea de investigación se designaron cebadores para PCR para amplificar el ADNc codificando estas regiones conservadas del dominio de unión ADN de los receptores hormonales nucleares. Esta estrategia apuntó a la clonación de presuntamente todos los receptores nucleares expresados en un tejido dado o línea celular. Usando este alcance, los receptores huérfanos denominados receptor retinoide Z (RZR) $\alpha$  y RZR $\beta$  fueron luego identificados en células endoteliales de vena umbilical (Becker-Andre *et al*, 1993) y cerebro de rata (Carlberg *et al*, 1994).

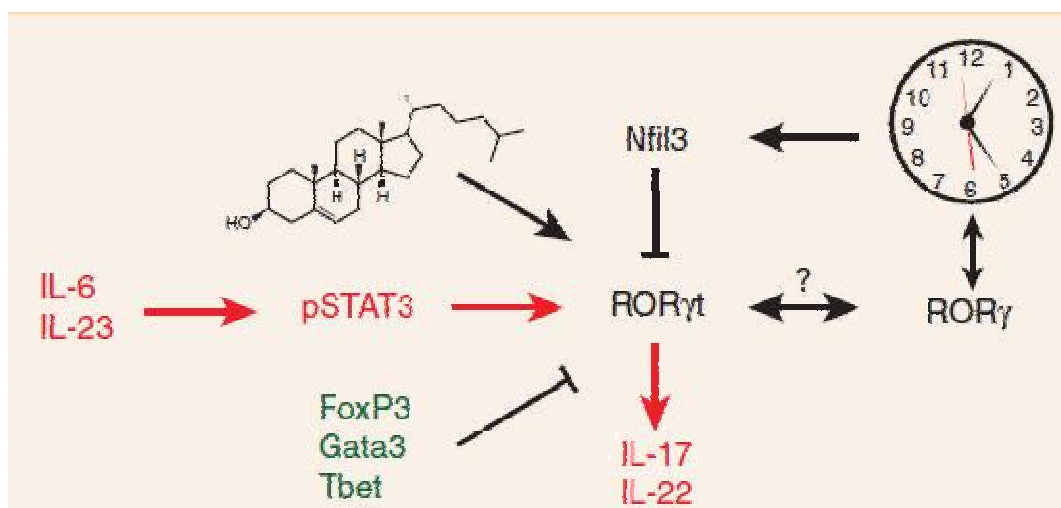
En la segunda línea de investigación, en un escaneado de proteínas que conferían resistencia a la apoptosis mediada por TCR, una isoforma corta de ROR $\gamma$  fue identificada mediante la clonación de expresión de una biblioteca de ADNc en un hibridoma de células T. Aunque ROR $\gamma$  es expresado en una variedad de órganos, se ha encontrado que esta nueva isoforma puede ser primariamente expresada en el timo y fue luego denominada ROR $\gamma$ t. Los ratones que carecen de la expresión de ROR $\gamma$  y ROR $\gamma$ t mostraron un incremento en la apoptosis de timocitos (He *et al*, 1998; Sun *et al*, 2000; Kurebayashi *et al*, 2000). Estos ratones también poseían remarcables fenotipos de ausencia de linfonódulos y placas de Peyer. En ratones “knock-in” en los cuales el locus *Rorc*( $\gamma$ t) codificaba a GFP en vez de ROR $\gamma$ t, pero aún expresaba ROR $\gamma$ , fue demostrado que ROR $\gamma$ t es expresado por y requerido para el desarrollo de células inductoras de tejido linfóide fetal (LTi) (Eberl *et al*, 2004), un tipo celular enigmático que coloniza los tejidos

linfoides en desarrollo en el feto antes que cualquier otro tipo celular hematopoyético (Mebius *et al*, 1996; Mebius *et al*, 1997; Adachi *et al*, 1997).

Sin embargo, fue la asociación de ROR $\gamma$ t con las células Th17 que llevo a ROR $\gamma$ t a la fama universal. En base a los perfiles del transcriptoma, las células Th17 expresan altos niveles de ROR $\gamma$ t comparadas con las células Th1, una observación que llevo a la demostración que Th17, así como las células LTi, expresan ROR $\gamma$ t y requieren ROR $\gamma$ t para su generación (Ivanov *et al*, 2006). El subgrupo Th17 aumenta el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la inflamación para combatir con patógenos bacterianos extracelulares. Este subgrupo es únicamente inducido por el estímulo combinado de células T naive con IL-6 y TGF- $\beta$  mediante la activación del receptor nuclear orfano ROR $\gamma$ t (Zhu y Paul, 2008).

ROR $\gamma$  y ROR $\gamma$ t son ambas codificadas dentro del locus *Rorc* y difieren solo en su secuencia amino-terminal debido a la utilización de diferentes promotores (Eberl y Littman, 2003). Ambos son miembros de la familia de receptor hormonal nuclear orfano relacionado al ácido retinoico que también incluye ROR $\alpha$  y ROR $\beta$  (Jetten, 2004). Mientras que ROR $\gamma$  es expresado ampliamente y no se ha definido su función ROR $\gamma$ t es expresado exclusivamente en células del sistema inmune (Ivanov *et al*, 2006).

La regulación de ROR $\gamma$ t ocurre a nivel de proteína-proteína. Itch es una ligasa ubiquitina E3 que une ROR $\gamma$ t y la señala para su ubiquitinación y degradación (Kathania *et al*, 2016). En ausencia de Itch, los ratones desarrollan inflamación intestinal dependiente de IL-17 y tumorigénesis. El óxido nítrico también regula la actividad de ROR $\gamma$ t mediante la nitrificación de residuos de tirosina (Jianjun *et al*, 2013). Como consecuencia, los ratones deficientes de iNOS desarrollan una diferenciación mejorada de Th17. A nivel de factor transcripcional (Figura 1), FoxP3 se une directamente a ROR $\gamma$ t y parece imponer su programa anti inflamatorio en células Tregs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> por encima del programa pro inflamatorio inducido por ROR $\gamma$ t (Zhou *et al*, 2008; Lochner *et al*, 2008). Gata3, el factor transcripcional emblemático de las respuestas tipo 2, se une directamente e inhibe al promotor *Rorc* (Wohlfert *et al*, 2011). Finalmente, T-bet, el factor transcripcional de respuestas tipo 1, previene que Runx1 regule la trans-activación de *Rorc* (Lazarevic *et al*, 2011).



**Figura 1.** La molécula RORγt. Las citoquinas inductoras tipo 3 IL-23 e IL-6 inducen la fosforilación del factor de transcripción STAT3, el cual luego activa *Rorc(γt)*, el gen codificante para RORγt que es esencial para la generación de las ILC3s y las células RORγt<sup>+</sup>. El RORγt induce la expresión de citoquinas efectoras tipo 3 IL-17 e IL-22. FoxP3, el factor de transcripción emblemático de las células T reg, se une a RORγt y generalmente impone un fenotipo regulatorio a las células FoxP3<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup> (T reg). Similarmente, Gata3 y T-bet, los factores transcripcionales principales de las células linfoides tipo 2 y tipo 1 respectivamente, bloquean la expresión de RORγt. La expresión de RORγt está bajo control del ritmo circadiano, ya que Nfil3, regulado por genes horarios, reprime a *Rorc(γt)*. RORγ está involucrado en la regulación de los ciclos circadianos, pero no está normalmente expresado por células hematopoyéticas. Los ligandos naturales de RORγt han sido recientemente identificados como oxisteroles, la biología de los cuales se mantiene aún por estudiar (Eberl, 2016).

RORγt es expresado en el estadio doble positivo del desarrollo de células T, pero está ausente en timocitos más maduros y en células T maduras en el bazo y linfonódulos periféricos (Eberl *et al*, 2004). En la periferia, hemos encontrado que la expresión de GFP (o RORγt) fue limitada a la población de células inductoras de tejido linfoide dependientes de RORγt (LTi) en el feto y una población con fenotipo similar en los criptoparches intestinales adultos y folículos linfoides (Eberl y Littman, 2004; Sun *et al*, 2000).

En ratones mantenidos bajo condiciones libres de patógeno-específicos, células IL-17<sup>+</sup> estaban presentes en la lámina propia del intestino delgado (proximal y distal), ciego,

colon y recto. Sin embargo, la lámina propia del intestino delgado contenía una proporción mayor de células T IL-17<sup>+</sup>. Muy pocas células en el compartimiento IEL (células epiteliales intestinales) expresaron IL-17. No se observó células RORγt/GFP<sup>+</sup> o T IL-17<sup>+</sup> fuera del intestino en otros órganos linfoides secundarios. Estas observaciones sugieren que las señales de la microflora intestinal podrían regular la diferenciación de las células Th17 intestinales en la lámina propia. Se evaluó la presencia de células IL-17<sup>+</sup> en la lámina propia de ratones deficientes de MyD88 descubriéndose que solo una leve disminución en el porcentaje de estas células en animales mutantes, indicando que, si las células Th17 intestinales se diferencian en respuestas a señales desde el lumen, luego otras rutas de señalización son probablemente involucradas (Ivanov *et al*, 2006).

En ausencia de citoquinas polarizantes exógenas, la sobreexpresión de RORγt resultó en la inducción de IL-17 en una gran fracción de las células T transducidas (GFP<sup>+</sup>) de C57BL/6 o ratones Balb/c. Para eliminar cualquier posibilidad de que las citoquinas producidas por células presentadoras de antígenos contaminantes contribuyen a la inducción de IL-17 por RORγt, se repitieron los experimentos usando células T CD4<sup>+</sup> naive altamente purificadas. La transducción de RORγt resultó en la expresión de IL-17 en más de la mitad de las células en la ausencia de citoquinas exógenas. Juntos estos resultados indican que RORγt es suficiente para inducir la expresión de IL-17 y IL-17F en células T CD4<sup>+</sup> naive estimuladas por antígeno y son consistentes con un rol negativo de RORγt de su inducción por IL-6 y TGF-β (Ivanov *et al*, 2006).

Una población de células tipo LTi fue identificada, expresando marcadores de células natural killer (NK), tales como Nkp46, así como también las citoquinas IL-17 e IL-22, pero no agrupan o inducen el desarrollo de tejidos linfoides (Satoh-Takayama *et al*, 2008; Luci *et al*, 2009; Sanos *et al*, 2009; Cella *et al*, 2009). Para mantener el control del universo en expansión de las células tipo LTi, el término “células linfoides innatas” (ILCs) fue acoplado (Spits *et al*, 2013; Spits y Di Santo, 2011). Se descubrió progresivamente que el universo ILC incluía a ILC1s, ILC2s, y ILC3s (RORγt<sup>+</sup>), las cuales imitaban a las células Th1, Th2 y Th17 en la expresión de factores transcripciones emblemáticos, marcadores de superficie y citoquinas efectoras (Eberl *et al*, 2015).

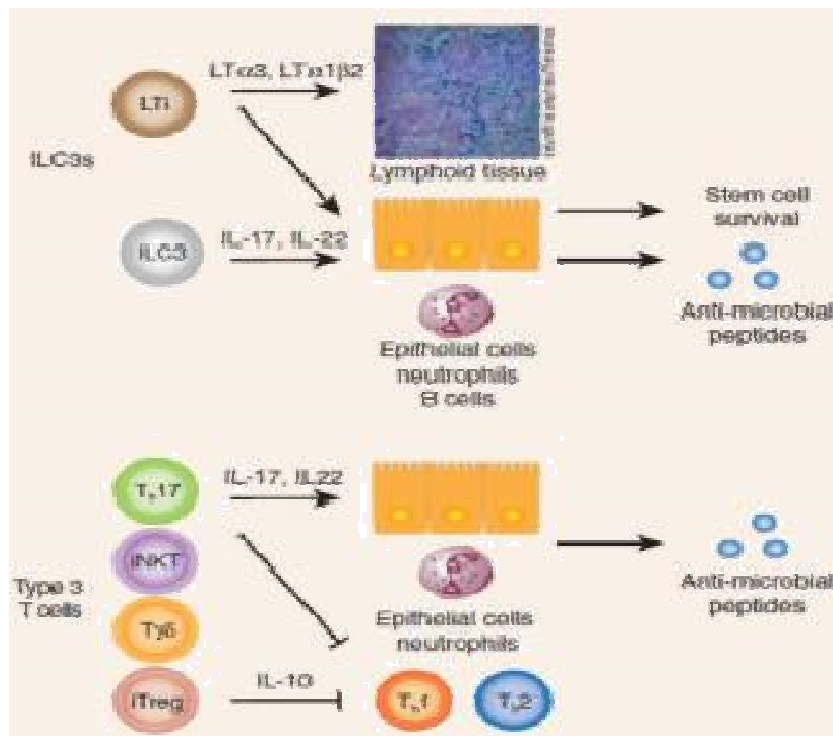
Una reciente observación trae devuelta la descripción original de RORγt como un primo de los receptores RORα y RORβ de melatonina (Becker-Andre *et al*, 1994; Wiesenberg

*et al*, 1995; Carlberg y Wiesenberg, 1995). ROR $\gamma$  es un componente de la red transcripcional de relojes circadianos periféricos (Preitner *et al*, 2002; Ueda *et al*, 2002), los cuales regulan al factor transcripcional Nfil3, el cual, a su vez, reprime la expresión de ROR $\gamma$ t (Yu *et al*, 2013). La desregulación del reloj circadiano conlleva entonces a la desregulación de las células Th17 y a la susceptibilidad incrementada a patologías inflamatorias. Finalmente, los metabolitos de colesterol son ligandos naturales de ROR $\gamma$ t (Santori *et al*, 2015; Cyster *et al*, 2014), posiblemente entrelazando la inmunidad tipo 3 al sistema endocrino y metabolismo, aunque la biología de estos ligandos permanezca por ser estudiada y entendida.

El descubrimiento de ROR $\gamma$ t permitió demostrar formalmente que las células LTi son requeridas para el desarrollo de los tejidos linfoides (Eberl *et al*, 2004). En el feto, las células LTi son las únicas que expresan ROR $\gamma$ t. En ratones deficientes de ROR $\gamma$ t, las células LTi eran ausentes y los linfonódulos y placas de Peyer fallaban en desarrollarse. Estas células expresan varios miembros de la superfamilia TNF, tales como la linfotóxina soluble  $\alpha_3$  (LT) y su variante unida a membrana LT $\alpha_1\beta_2$ , citoquina inducida por activación relación con TNF (TRANCE) y TRANCE-L (Yoshida *et al*, 1999; Kim *et al*, 2000), LT $\alpha_1\beta_2$  es esencial para el desarrollo de tejidos linfoides (De Togni *et al*, 1994; Rennert *et al*, 1996; Alimzhanov *et al*, 1997), ya que está activa LT $\beta$ R en células estromales especializadas, las cuales a su vez inducen la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas que reclutan linfocitos y células mieloides (Dejardin *et al*, 2002).

La pronta respuesta de las ILCs contra la infección y daño las coloca arriba en la respuesta inmune. Las ILC3s son activadas por las citoquinas inductoras IL-1 $\beta$  e IL-23 producidas por macrófagos y células dendríticas (DCs) típicamente en respuesta a infección bacteriana y hongos. Las ILC3s activadas producen citoquinas efectoras IL-17, IL-22, GM-CSF, LT $\alpha_3$ , y LT $\alpha_1\beta_2$ , la cual, a su vez, induce la producción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales (Eberl *et al*, 2015; Wang *et al*, 2010), de quimiocinas reclutantes de neutrófilo por células estromales y epiteliales, y la activación de células B (Figura 2) (Kruglov *et al*, 2013; Magri *et al*, 2014).





**Figura 2.** Las células  $ROR\gamma t^+$ . Incluyen las células linfoides innatas tipo 3 (ILC3s) y varios subgrupos de células T (células Th17, células NKT invariantes, células  $T\gamma\delta$  y un subgrupo de neutrófilos productores de IL-17 que ha sido documentado en ratones y humanos). Todas las células  $ROR\gamma t^+$  pueden expresar las citoquinas efectoras IL-17 e IL-22 en varios grados, excepto la mayoría de las células T regulatorias  $ROR\gamma t^+$  (inducidas por la microbiota o iTregs) que expresan IL-10. Un subgrupo de ILC3s, denominado células inductoras de tejido linfoide (LTi), expresa (LTα3) soluble y linfotoxina (LTα1β2) unida a membrana, así como TRANCE y TRANCE ligando, los cuales están involucrados en el desarrollo de tejido linfoide en el feto y después del nacimiento en la lámina propia intestinal y la activación de células B. IL-17, así como LTα1β2, induce el reclutamiento de neutrófilos, IL-22 previene la apoptosis de células madre epiteliales y tanto IL-17 como IL-22 inducen la producción péptidos antimicrobianos (AMPs) por las células epiteliales. Las células T regulatorias  $ROR\gamma t^+$  son inducidas por la microbiota simbiótica y regulan las respuestas tipo 1 y tipo 2 (Eberl, 2016).

Por otra parte, las ILC3s contribuyen a la patología inflamatoria a través de su capacidad para co expresar IFNγ durante la infección con *Salmonella* en ratones (Klose *et al*, 2013). Otra característica sorprendente de las ILC3s es la expresión del complejo mayor de

histocompatibilidad tipo II (MHC) (Eberl *et al*, 2004; Mebius *et al*, 1997) así como también de varios componentes de la ruta de procesamiento de antígenos tipo II. Esta característica permite a las ILC3s presentar antígenos y reprimir la actividad de células T específicas en el intestino durante la homeostasis (Hepworth *et al*, 2013), y para inducir la activación en el bazo (von Burg *et al*, 2014). El rol relativo de las ILC3s, DCs, y macrófagos en la activación restringida por MHC tipo II y la regulación de células T (Mortha *et al*, 2014), al menos en el intestino y tejido linfoide permanece por ser estudiado.

ILC3 expresa el factor de transcripción ROR $\gamma$ t, pero son posteriormente subdivididos dependiendo de la expresión de receptores citotóxicos naturales (NCRs), tales como NKp46 (ratón) o NKp44 (humano). NCR<sup>+</sup> ILC3 está involucrado en protección de infecciones bacterianas agudas o daño agudo al epitelio intestinal. Estas células hacen recordar a las células Th22, en el hecho que solo producen IL-22, pero no IL-17A, sin embargo, estas expresan tanto ROR $\gamma$ t y el receptor arilhidrocarbon (AHR), mientras que las células Th22 solo expresan AHR. Las ILC3 NCR<sup>-</sup> son la contraparte innata de las células Th17. Estas células co producen IL-17 e IL-22 y expresan el factor transcripcional ROR $\gamma$ t. En suma, a sus importantes roles en la defensa del hospedero, las ILCs están también involucradas como mediadores de enfermedades auto-inmunes en el intestino (Powel y MacDonald, 2017).

Las ILC3s son importantes para varios procesos en la inmunidad mucosal, desde el desarrollo de tejidos linfoides a la contención de la microbiota, la inmunidad temprana a patógenos y la protección de células epiteliales, a la exacerbación de la patología inflamatoria y la progresión del cáncer. Por más que las células ILC3s dependen de ROR $\gamma$ t para su desarrollo, permanece en ser determinado si es que ROR $\gamma$ t es también requerido para su mantenimiento, una importante consideración al apuntar a ROR $\gamma$ t con agonistas o antagonistas para regular las respuestas inmune tipo 3 (Solt *et al*, 2011; Huh *et al*, 2011).

FoxP3 es el factor de transcripción emblemático para las células T regulatorias (Treg), una proporción significativa de células T FoxP3<sup>+</sup> intestinales expresaron ROR $\gamma$ t (Lochner *et al*, 2008). Se sugiere que las células FoxP3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> no son Tregs, sino células T precursoras que expresan ambos factores transcripcionales hasta que la expresión de uno

sea mayor que la otra para generar Tregs o células Th17 (Zhou *et al*, 2008). Esta hipótesis fue derivada de observaciones que el 25% de las células Th17 intestinales habían expresado FoxP3 en algún punto de su desarrollo, como fue determinado por un mapeo de destino genético de células FoxP3<sup>+</sup>. También, fue sugerido que las Tregs adquieren características de células efectoras, inducidas por el estado inflamatorio del tejido (Wohlfert y Belkaid, 2010).

En un estudio, la ausencia de células Tregs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> llevo a un incremento en las células Th1 y Th17, y a la exacerbación de colitis (Sefik *et al*, 2015). Sin embargo, en otro estudio, las células Tregs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> no controlaron las células Th1 y Th17 sino las células Th2 (Ohnmacht *et al*, 2015). Se propuso que las bacterias inducen respuestas tipo 3, mediadas por células Th17 y Tregs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, las cuales colectivamente reprimen la competencia de respuestas tipo 1 o tipo 2, un fenómeno descrito por un modelo de equilibrio de inmunidad (Eberl, 2016). Como consecuencia, en ratones que carecen de células ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> o Th17, las respuestas anti-helmínticas son incrementadas y la inflamación alérgica es exacerbada. Por lo tanto, la microbiota regula la alergia a través de la inducción de respuestas tipo 3 (Ohnmacht *et al*, 2015).

Las células T helper que secretan IL-17, a diferencia de las células Th1 productoras de IFN- $\gamma$ , son las principales células inflamatorias en un número de modelos de enfermedad, y que la función de estas células es dependiente de IL-23 (Chen *et al*, 2006; Cua *et al*, 2003; Langowski *et al*, 2006; Mangan *et al*, 2006; Yen *et al*, 2006). Se encontró que ROR $\gamma$ t es requerido para las respuestas patogénicas de Th17 en EAE (Encefalomiелitis autoinmune experimental). En el sistema nervioso de animales con células T deficientes de ROR $\gamma$ t, las citoquinas características de células Th17 fueron significativamente reducidas, pero las citoquinas Th1 estaban normalmente expresadas. La ausencia de células Th17 llevó a una disminución en las quimiocinas pro inflamatorias, consistente con el rol de la ruta IL-23-IL-27 en el reclutamiento de células inflamatorias a los sitios de inflamación (McKenzie *et al*, 2006; Stark *et al*, 2005).

ROR $\gamma$ t es un extraordinario receptor nuclear y factor de transcripción, el cual controla la inmunidad tipo 3, una rama crítica de respuestas inmunes que contienen a la microbiota simbiótica en superficies mucosas y combate patógenos bacterianos y fúngicos (Eberl, 2016).

## 2.7 IL-17

El nombre de IL-17 fue propuesto por primera vez por Yao *et al*, 1995 cuando descubrieron que un marco de lectura abierto del gen 13 del herpesvirus saimiri T linfotrópico (HSV13) exhibía 58% de homología con una molécula previamente clonada, proteína 8 asociada a linfocito T citotóxico de ratón (CTLA-8). El HSV13 recombinante y CTLA-8 estimulan la actividad del factor de transcripción NFκB y la secreción de IL-6 en fibroblastos y co-estimulan la proliferación de células T. Un nuevo receptor de citoquina fue también aislado y demostrado en unirse tanto a HSV13 como a CTLA-8. Por lo tanto, el CTLA-8 del ratón fue denominado IL-17, HSV13 como IL-17 viral, y el nuevo receptor de citoquina clonado como IL-17R (Chu, 2017).

IL-17 es el miembro fundador de una nueva familia de citoquinas inflamatorias. Mientras que el miembro fundador de una nueva familia de citoquinas inflamatorias. Mientras que las propiedades pro-inflamatorias de IL-17 son clave para su capacidad protectora de hospedero, la señalización desmedida de IL-17 es asociada con inmunopatología, enfermedad autoinmune, y progresión del cáncer (Amatya *et al*, 2017).

IL-17 (IL-17A, originalmente llamado CTLA-8) fue clonado en 1993, pero sus funciones permanecen oscuras por cerca de una década (Rouvier *et al*, 1993). En el 2005, IL-17 se hizo notar con el descubrimiento de una nueva población de células T helper CD4<sup>+</sup> caracterizadas por la expresión de IL-17. Este subgrupo fue denominado como células t helper tipo 17 (Th17) (Amatya *et al*, 2017).

Aunque las células Th17 son típicamente consideradas la fuente principal de IL-17, las células CD8<sup>+</sup> también demostraron producir esta citoquina y son denominadas “Tc17”. En suma, varios subgrupos inmunes innatos producen esta citoquina, incluyendo linfocitos de acción innata tales como las células T γδ, algunas células natural killer (NKT), y células Th17 TCRβ<sup>+</sup> naturales. Así también, las células linfoides innatas tipo 3 expresando IL-17 (ILC3s) han sido descritas, las cuales carecen de un receptor de antígeno y sirven como contrapartes innatas de las células Th17 (Cua y Tato, 2010). Las células mieloides también han sido reportadas en producir IL-17, aunque no en grandes cantidades. Colectivamente, las células productoras de IL-17, ya sean adaptativas o innatas, son denominadas tipo 17 (Amatya *et al*, 2017). Así también neutrófilos y células

mastocíticas liberan IL-17 durante infecciones en el contexto de inflamación tisular (Taylor *et al*, 2014; Keijsers *et al*, 2014)

Una característica común de los linfocitos innatos y adaptativos secretando IL-17 es la expresión del factor de transcripción receptor  $\gamma$ t orfano relacionado al receptor del ácido retinoico (ROR $\gamma$ t; el cual es codificado por Rorc) (Gao *et al*, 2015; Maggi *et al*, 2010). El compromiso de los linfocitos T naive hacia las células productoras de IL-17 es promovida por la combinación de las citoquinas TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-1 (Bettelli *et al*, 2006; Santarlasci *et al*, 2009; Acosta-Rodríguez *et al*, 2007). Esta información sugiere que las células Th17 funcionalmente distintas existen, llamadas células “Th17 patogénicas” productoras de IFN- $\gamma$ , versus las células “Th17 no patogénicas” co-productoras de IL-10 (Zielinski *et al*, 2012; Noster *et al*, 2016). En contraste con reportes previos, ha sido demostrado recientemente que la citoquina pro-inflamatoria GM-CSF no está asociada con la diferenciación Th17, sino, estas son co-expresadas con IFN- $\gamma$  por las células Th1 (Zielinski, 2014).

La función más resaltante de IL-17 es de proveer una respuesta inflamatoria protectora hacia los patógenos en tejidos limitantes, tales como la piel, intestino y pulmones. La secreción defectuosa de IL-17 ha sido observada en candidiasis mucocutánea crónica (Eyerich *et al*, 2008; Puel *et al*, 2011), y IL-17 parece ser crucial para respuestas inmunes efectivas contra *Mycobacterium tuberculosis*, infecciones de piel por *Staphylococcus aureus*, infección gastrointestinal por *Escherichia coli* entre muchas otras (Isailovic *et al*, 2015; O'Connor *et al*, 2009). Esta función defensiva de IL-17 es realizada mediante la inducción de células epiteliales para liberar CXCL8 y CXCL1, potentes quimio atrayentes neutrofílicos, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un factor de supervivencia para neutrófilos, CCL20, el cual promueve el reclutamiento de células Th17, factor estimulante de colonias macrófago granulocíticas (GM-CSF), y péptidos antimicrobianos tales como b-defensina-2, mucinas (MUC5AC y MUC5B) y proteínas S100 (S100A7, S100A8, y S100A9) (Pennino *et al*, 2010; Chiricozzi *et al*, 2014).

Los efectos pro inflamatorios y de defensa del hospedero de IL-17A e IL-17F son ejecutados principalmente por la activación de las rutas NF $\kappa$ B y MAPK. Una señal de IL-17R es primero retransmitida por una proteína citosólica, un adaptador de señalización llamado Act1 (Activador 1 NF $\kappa$ B, también conocido como CIKS) (Chang *et al*, 2006).

Varios estudios han demostrado que IL-17A es un potente inductor de la producción de IL-6 por varios tipos celulares. IL-6 es un potente estimulador de la diferenciación de células Th17 sugiriendo una retroalimentación positiva inducida por IL-17A, otras citoquinas pro inflamatorias incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1 $\beta$  y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) (Jovanovic *et al*, 1998; van Hamburg *et al*, 2011). IL-17 es también un potente inductor de NO sintasa y expresión de ciclooxigenasa que conlleva a un incremento en el óxido nítrico (NO) y prostanglandina E2 (PGE2) en varios tipos celulares siendo este proceso sinergizado por el TNF e IL-1 $\beta$  (Trajkovic *et al*, 2001; LeGrand *et al*, 2001).

La mayoría de efectos de IL-17 en las superficies epiteliales, incluyendo la inducción de MHC tipo II y expresión de ICAM-1, dependen de la actividad sinérgica de IL-17 con las citoquinas tipo 1, en particular TNF- $\alpha$  (Albanesi *et al*, 1999). Una segunda función de IL-17 es dirigir la remodelación tisular durante las respuestas inflamatorias. Esto es mediado ya sea directamente al promover la secreción de metaloproteinasas por varios tipos celulares, incluyendo sinoviocitos (Moran *et al*, 2009), o indirectamente al inducir la secreción de IL-6 en sinergismo con TNF- $\alpha$ , lo cual subsecuentemente activa STAT-3, un factor de supervivencia para las células epiteliales (Grivennikov *et al*, 2009). Finalmente, IL-17 también induce a claudin 1 y claudin 2, que están involucradas en la formación de uniones estrechas entre las células en el epitelio intestinal humano, asegurando la integridad intestinal (Kinugasa *et al*, 2000)

Numerosos estudios en ratones comenzando en los inicios del año 2000 indicó que la señalización IL-17R es crucial para la protección contra una variedad de infecciones fúngicas y bacterianas, particularmente los hongos comensales *Candida albicans* y la bacteria pulmonar *Klebsiella pneumoniae* (Gu *et al*, 2013).

La familia IL-17 consiste de seis citoquinas estructuralmente relacionadas IL-17A (IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) y IL-17F. IL-17A y IL-17F son las más cercanamente relacionadas, son co-expresadas en genes relacionados, y son usualmente co-producidas por las células tipo 17 (Akimzhanov *et al*, 2007). Similarmente, la familia IL-17R comprende de cinco subunidades de receptor, IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD y IL-17RE. IL-17RA es el miembro fundador de la familia IL-17R y es un correceptor usado por varios otros ligandos de la familia IL-17. IL-17 y IL-17F existen

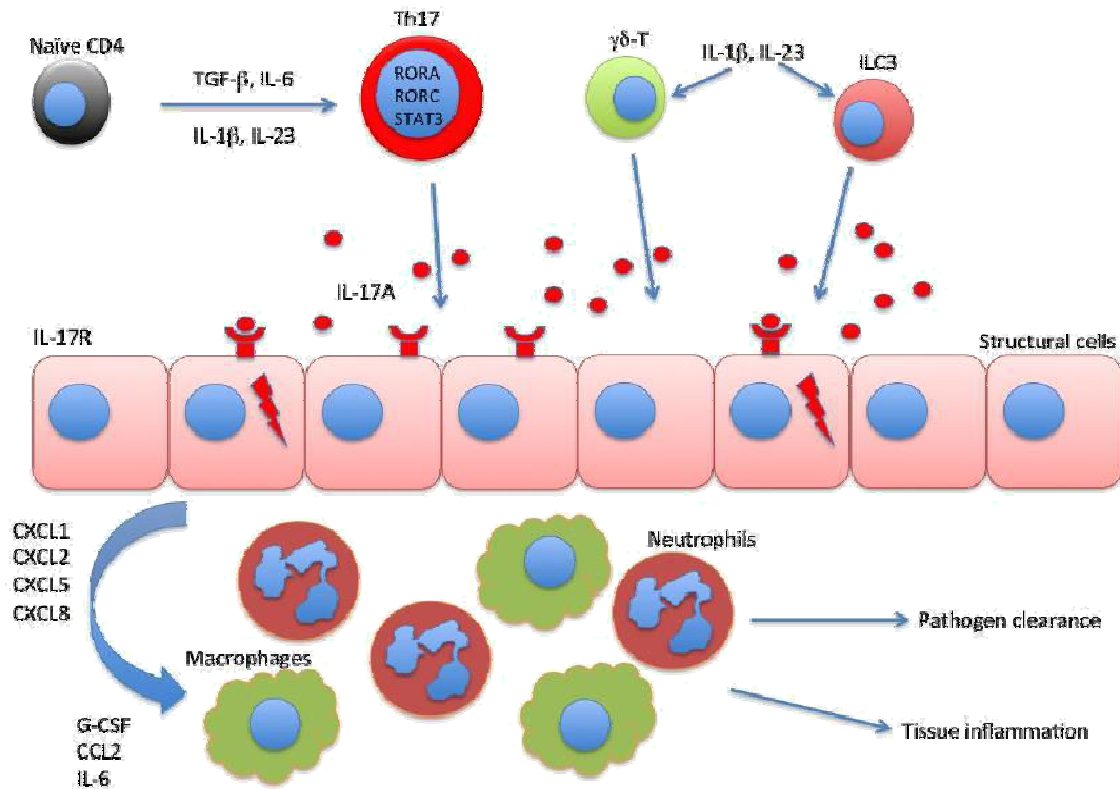
como homodímeros o como heterodímeros, y todas las formas de la citoquina inducen señales a través de un complejo receptor obligado dimérico IL-17RA y IL-17RC (Amatya *et al*, 2017; Eyerich *et al*, 2017).

La unión de IL-17 a su receptor lleva al reclutamiento de la proteína adaptable Act1, la cual interactúa con las proteínas de andamiaje TRAF6 y TAK1 para activar NF- $\kappa$ B y p38/MAPKs (Iwakura *et al*, 2011).

Los miembros de la familia IL-17R son definidos por la conservación de un motivo conocido como dominio SEFIR (expresión similar de factor de crecimiento fibroblástico y IL-17R), un motivo que está relacionado lejanamente al dominio “Toll/IL-1R” (TIR) encontrado en los miembros de la familia receptor IL-1 y tipo Toll (Novatchkova *et al*, 2003).

Act1, también conocido como CIKS (conexión a I $\kappa$ B quinasa y proteína quinasas activadas por estrés), es un adaptador citosólico único requerido para la activación de todas las rutas de señalización conocidas dependientes (Gu *et al*, 2013; Leonardi *et al*, 2000). Act1 contiene un dominio SEFIR e interactúa con IL-17RA y IL-17RC a través de interacciones SEFIR homotípicas (Novatchkova *et al*, 2003; Chang *et al*, 2006). Consistente con este rol central de Act1, los péptidos señuelos solubles que imitan al interfaz predicho Act1:IL17RA bloquea las actividades de señalización tanto de IL-17A como IL-25 (IL-17E) (Liu *et al*, 2011). En adición al dominio SEFIR, los primeros estudios de mutagénesis de IL-17RA identificaron una región no conservada requerida para la función de señalización de IL-17RA que extiende hasta 100 residuos más allá de SEFIR, denominado “Extensión SEFIR” (dominio SEFEX) (Maitra *et al*, 2007; Onishi *et al*, 2010).

La cola citoplasmática de IL-17RA adicionalmente contiene un dominio distal distinto de SEFIR/SEFEX cuya función está asociada con la regulación negativa de la señalización. Los primeros estudios de este motivo fueron basados en correlaciones con la activación del factor de transcripción CCAAT/proteína de unión potenciadora (C/EBP)-B (Maitra *et al*, 2007; Shen *et al*, 2009).



**Figura 3.** Ilustración esquemática de la ruta de señalización que involucra a IL-17A en las enfermedades inflamatorias. Las células T CD4 naïve se diferencian en células T productoras de IL-17 bajo la presencia de citoquinas como TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23. La diferenciación Th17 es controlada por los factores de transcripción *RORA*, *RORC* y *STAT3*. Las células linfoides innatas tipo 3 (ILC3) y las células T  $\gamma\delta$  pueden también producir IL-17 en respuesta a la estimulación por IL-1 $\beta$  e IL-23. IL-17A actúa sobre células estructurales tales como las células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos en varios tejidos incluyendo la piel, intestino y pulmón. Las células estructurales que expresan el receptor de IL-17 (IL-17R) producen citoquinas inflamatorias tales como G-CSF e IL-6 así como también quimiocinas para atraer neutrófilos y macrófagos a los tejidos inflamados. Estas células inflamatorias pueden eliminar la infección e iniciar la inflamación patogénica (Chen y Kolls, 2017).

IL-17 aumenta la regulación de la expresión génica inflamatoria mediante la transcripción génica *de novo* o mediante la estabilización de transcritos ARNm objetivos. Aunque IL-17R es expresada ubicuamente, las células no hematopoyéticas son generalmente aquellas que responden primero a IL-17 (Gaffen *et al*, 2014). El rol pro-inflamatorio de IL-17 fue primeramente demostrado en activar NF-K $\beta$  e inducir a las citoquinas NF-K $\beta$



dependientes (Yao *et al*, 1995; Fossiez *et al*, 1996; Awane *et al*, 1999). Estudios subsecuentes delinearon una señal genética clave característica de IL-17 que incluía citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas, péptidos antimicrobianos (AMPs), metaloproteinasas de matriz (MMPs), y efectores inflamatorios (Iwakura *et al*, 2011; Onishi *et al*, 2010)

Así también, hay un patrón distinto tejido-específico de genes IL-17 dependientes que subyace dentro de las diversas funciones fisiológicas de esta citoquina (Chang y Dong, 2011). Por ejemplo, IL-17 regula varios genes ampliamente restringidos al epitelio intestinal, tales como ocludin (*Ocln*), proteína 3γ regeneradora derivada de islote (Reg3g), y mucin 1 (*Muc1*), las cuales todas contribuyen al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal. En las células natural killer (NK), IL-17 fue reportado en inducir la expresión de GM-CSF (*Csf2*), uno de los pocos ejemplos documentados de señalización dependiente de IL-17 en células hematopoyéticas (Bar *et al*, 2014).

Aunque IL-17 es un mediador crucial de la inflamación (Figura 3), es un modesto activador de señalización comparado con otros estímulos inflamatorios. Sin embargo, su capacidad para sinergizar con otras señales inflamatorias hace que este sea un efector inflamatorio vital. Esto es biológicamente altamente relevante en el contexto de un tejido inflamatorio, donde las condiciones no son llevadas independientemente por una única citoquina sino por el resultado de acciones concertadas de múltiples mediadores inflamatorios (Miossec, 2003).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Procedencia y procesamiento de muestras

Las muestras procesadas provienen de alpacas de la estación experimental de IVITA, en el Departamento de Cusco, provincia de Canchis, distrito de Maranganí; obtenidas entre los meses de enero y marzo del 2015.

Se establecieron 3 grupos etarios, cada uno estuvo constituido por 6 crías de alpaca que no manifiestan signos de enfermedad, a excepción del primer grupo etario donde fueron 5 (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características de los grupos etarios asignados en el estudio.

GRUPO ETARIO	NÚMERO DE INDIVIDUOS	CARACTERÍSTICAS
Animales calibradores	2	Neonato
Grupo 1	5	Animales de 2 a 7 días
Grupo 2	6	Animales de 8 a 20 días
Grupo 3	6	Animales de 26 a 47 días

Los calibradores (n=2) corresponden a neonatos que están exentos de los componentes transferidos a través de la inmunidad pasiva lográndose esto mediante la remoción inmediata de la cría justo al momento después de nacer, por lo que no están influenciados por estos factores mencionados ni por factores externos.

La designación de los grupos etarios se basó en trabajos anteriores de expresión de citoquinas en alpacas clínicamente sanas de 1 a 6 semanas de vida (Burga, 2016; Bardález *et al*, 2013; Chiok, 2012; Herrera, 2012; More *et al*, 2011), mostrando un notable aumento de la expresión en animales de aproximadamente 2 a 8 días de edad y un mayor aumento en animales de 10 a 21 días de edad aproximadamente. En animales de aproximadamente 30 a 40 días de edad se encuentra un descenso de la expresión en algunas citoquinas o un mayor aumento de la expresión en otras citoquinas. Además, cada grupo etario coincide con la aparición de determinados patógenos, teniendo conocimiento que en las primeras semanas de vida de la alpaca se ven afectadas por la presencia de *Cryptosporidium* spp (Palacios, 2008; Villacorta *et al*, 2009), *Giardia* spp (Gomez-Couso *et al*, 2012; Gomez-Puerta *et al*, 2014), *Rotavirus*, *Betacoronavirus* (Luna *et al*, 2015) y en animales de 30 días a más presentan alta prevalencia de *Eimeria* spp (Rodríguez *et al*, 2012).

Se tomó una porción transversal de 2 cm de longitud del segmento medio del yeyuno de forma aséptica, este segmento se utilizó para la técnica RT-PCR. Estos segmentos se obtuvieron en el laboratorio del centro de investigación del IVITA Maranganí, utilizando vestimenta y material quirúrgico estéril. Los segmentos fueron inmediatamente lavados en suero fisiológico al 0.9% para eliminar restos de contenido intestinal potencialmente inhibidores de la técnica RT-PCR tiempo real e inmediatamente después se colocaron en crioviales estériles de 2 ml de capacidad previamente rotulados y congelados en nitrógeno líquido (-196°C) para su transporte hacia el laboratorio.

### **3.2 Extracción de ARN total**

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Microbiología, Sección Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, fueron retiradas del tanque de nitrógeno líquido, se cortaron y pesaron dentro de un rango de 100 a 150 mg. Se trituraron en un mortero y pilón estériles conservándose a -20°C en todo el proceso con la constante adición de nitrógeno líquido. Para la extracción del ARN total se empleó el método combinado de “Trizol® Reagent” y el kit comercial “PureLink™ RNA Mini Kit” (Invitrogen, USA). El ARN obtenido se cuantificó usando el kit Quant – it™ (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen, USA) (Cuadro A1). Una vez cuantificado se procedió a realizar diluciones

en agua libre de nucleasas para trabajar con 1 µg en un volumen de 2 µl por muestra y usarla en el RT-PCR tiempo real.

### 3.3 Síntesis de ADNc (Transcripción reversa)

El ARN obtenido de cada una de las muestras fue tomado como templado para la síntesis de ADNc (ADN complementario) empleando el kit “SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen, USA), según las instrucciones del fabricante. El kit emplea la transcriptasa reversa MuLV H+ para generar ADNc a partir de moléculas de ARN templado en las muestras y viene proveído de dNTP, hexámeros al azar (0.2 µM, concentración final), oligo(dT)<sub>20</sub> y sales para optimizar la reacción.

Todo el material empleado fue nuevo y libre de nucleasas, adicionalmente, la habitación y materiales como pipetas, gradillas y demás materiales plásticos no perecibles se irradiaron con luz ultravioleta por un tiempo mínimo de 12 horas previas a su uso.

Se realizó una pre-mezcla con los reactivos del kit “SuperScript<sup>TM</sup> III” en tubos eppendorf de 2 ml de capacidad, nuevos y libres de nucleasas previo tratamiento de autoclavado por 3 veces. Esta pre-mezcla se realizó teniendo en cuenta el número de muestras y volumen final de la reacción y se mantuvieron en hielo durante su preparación y antes del uso para prevenir el inicio de la reacción a temperatura ambiente. En la pre-mezcla no se incluye el ARN.

2x RT Reaction mix	5 µl x n *
RT enzyme mix	1 µl x n
H <sub>2</sub> O	2 µl x n
ARN	2 µl
TOTAL	10 µl

n = número de muestras a trabajar

Una vez realizada la pre-mezcla se procede a distribuir 8 µl en cada tubo descartable para termociclador de 200 µl de capacidad. Seguidamente se procederá a distribuir los 2 µl de ARN templado (conteniendo 1 µg de ARN total) en cada uno de los tubos correspondientes. Las muestras se llevaron al termociclador Applied Biosystem® 7500

programado con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 25° C por 10 minutos, 50° C por 30 minutos, terminando la reacción a 85° C por 5 minutos. Se añadió 2 UI de RNasa H<sup>+</sup> de *E. coli* (proveído por el kit) a cada pocillo y se incubó a 37° C por 20 minutos para destruir la molécula ARN del híbrido ARN: ADNc. El ADNc obtenido fue congelado a -70° C hasta su uso en la reacción de PCR Tiempo Real.

### 3.4 PCR Tiempo Real

Para la realización de la técnica PCR Tiempo Real se utilizaron los siguientes cebadores (Cuadro 2).

Así mismo, se incluyeron oligonucleótidos para la amplificación específica de transcritos de GAPDH (Patil *et al*, 2004) como gen interno para la normalización de la cuantificación relativa.

**Cuadro 2.** Oligonucleótidos empleados para la técnica RT-PCR Tiempo Real de las citoquinas ROR $\gamma$ t e IL-17

Gen	Producto		Secuencia (5'-3')	Longitud	Acceso Genbank	Tm	GC%
IL17A	200	F	ACCGGAACACAAATTCCAAA	20	XM_006211540.1	60.21	40.00
		R	GACCAGGATCTCTTGCTGGA	20		60.35	55.00
RORC	203	F	CTGGCCTTTCATCACCATCT	20	XM_015250159.1	60.07	50.00
		R	CCCTCAGGTGACTCGA <sup>Y</sup> TTC	20		59.83	60.00
GAPDH	201	F	ATCACTGCCACCCAGAAGAC	20	XM_006210852.1	60.12	55.00
		R	GCACGTCAGATCCACAACAG	20		60.32	55.00

Se empleó el ADNc de cada una de las muestras como templado para la reacción de PCR con el kit “SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Una vez obtenidos, los cebadores fueron diluidos en agua libre de nucleasas para obtener soluciones de trabajo de 10  $\mu$ M de forma que su concentración final en la reacción fue de 0.2  $\mu$ M en todos los casos. Se utilizó material nuevo y libre de nucleasas, mientras que el espacio y materiales no perecibles plásticos fueron irradiados con luz ultravioleta anteriormente a su utilización.

Para la reacción del PCR Tiempo Real se utilizó el kit SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal y el termociclador Applied Biosystem ® 7500 real-time PCR system.

EL ADNc obtenido en la transcripción inversa se empleó como templado para la reacción de PCR. Luego se procedió a preparar el master mix mezclando los componentes del kit en un tubo eppendorf de 2 ml de capacidad, sin incluir el ADNc, siguiendo orden y volumen mostrando a continuación:

• SybrGreen Master Mix	12.5 µl
• Forward Primer	0.5 µl
• Reverse Primer	0.5 µl
• ROX (1:10)	0.5 µl
• H <sub>2</sub> O	9.0 µl
• ADNc	2 µl
• TOTAL	25 µl

Después de haber distribuido 23 µl de master mix en los tubos de PCR blanco correspondientes, se procedió a adicionar 2 µl de ADNc (conteniendo 20 ng de ADNc) en sus respectivos tubos.

El ADNc usado como templado deriva del ARN obtenido en el proceso de extracción, posteriormente diluido para trabajar con una concentración de 1 µg de ARN. El ADNc usado para la técnica PCR tiempo real fue diluido en 1:5 para obtener una concentración de 10 ng/µl con la finalidad de maximizar el uso de material genético extraído sin afectar la eficiencia de la técnica. En total se usó 20 ng de ADNc por reacción de PCR tiempo real.

Finalizando las mezclas, los tubos se introdujeron en el termociclador y se aplicó el siguiente protocolo usando el software 7500 v2.0.1:

50°C por 2 minutos (incubación con UDG)

95°C por 10 minutos (Inactivación UDG y activación de DNA polimerasa)

45 ciclos:

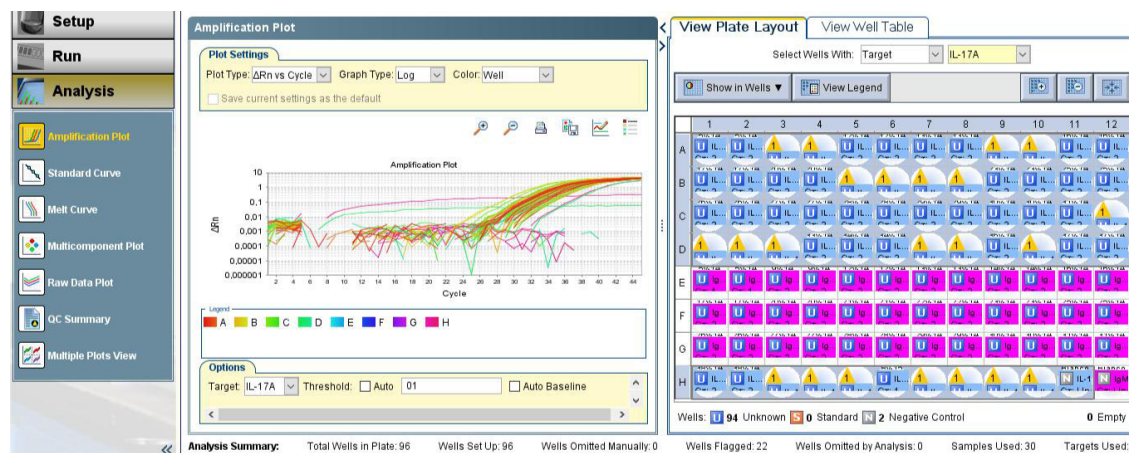
95°C por 15 segundos

60°C por 60 segundos

-Temperatura de melting: 65-95°C, cada 0.3°C, 3 segundos.

-Mantener a 8°C.

Los productos obtenidos en la técnica PCR fueron leídos usando el software 7500 v2.0.1 en el que se muestra la curva de amplificación o ciclo umbral (Ct) y una curva de disociación (Tm), determinando su especificidad (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema en el cual se observan los pocillos a ser evaluados por el software, en este caso pertenecientes a las muestras de IL-17. Cada curva de amplificación representa a cada pocillo a la derecha teniéndose de esta manera la representación cuantitativa de las muestras evaluadas.

### 3.5 Análisis de la expresión de genes

Se empleó la técnica  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  como técnica de cuantificación de la expresión relativa de genes detectables a través de RT-PCR Tiempo Real (Livak y Schmittgen, 2001). El método se basa en el análisis comparativo de los ciclos threshold (Ct) de las muestras a estudiar con el del calibrador (neonatos), comparados con el Ct de un control endógeno. Como gen endógeno para la normalización de la cuantificación relativa se utilizó el gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Donde:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al  
calibrador  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (muestra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$

$\Delta Ct \text{ (muestra)} = Ct \text{ gen de citoquina de interés (muestra)} - Ct \text{ control endógeno}$   
(muestra)

$\Delta Ct \text{ (calibrador)} = Ct \text{ gen de citoquina de interés (calibrador)} - Ct \text{ control endógeno}$   
(calibrador).

En este método los resultados son presentados como cantidades en número de veces con respecto a un calibrador (neonatos). Los resultados se interpretan como el gen de la citoquina en estudio se ha expresado “X” veces como el gen del calibrador. = Valor numérico resultado del método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 3.6 Análisis estadístico

Se analizó la expresión de ARNm a través de la cuantificación relativa de cada una de las citoquinas IL-17, ROR $\gamma$ t y GAPDH en cada uno de los distintos grupos etarios (grupo 1, 2 y 3) en crías de alpacas (neonatos). Se usó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si las variables siguen la distribución normal. Los valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de las muestras intestinales de las crías de alpacas sanas se usaron para calcular la varianza, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV). En las variables que siguieron la distribución normal se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en al menos uno de los grupos etarios. Para determinar en qué grupos etarios existe diferencia estadística significativa se usó la prueba Post hoc de Bonferroni. Para las variables que no siguen la distribución normal se usó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en el menos uno de los grupos etarios. Para determinar en qué grupos etarios existe diferencia estadística significativa se comparó con los diferentes grupos usando la prueba U de Mann-Whitney multiplicando el “valor p” por el número de comparaciones. Los datos se procesaron mediante el software estadístico STATA versión 14 estableciendo la significación estadística de 0.05.



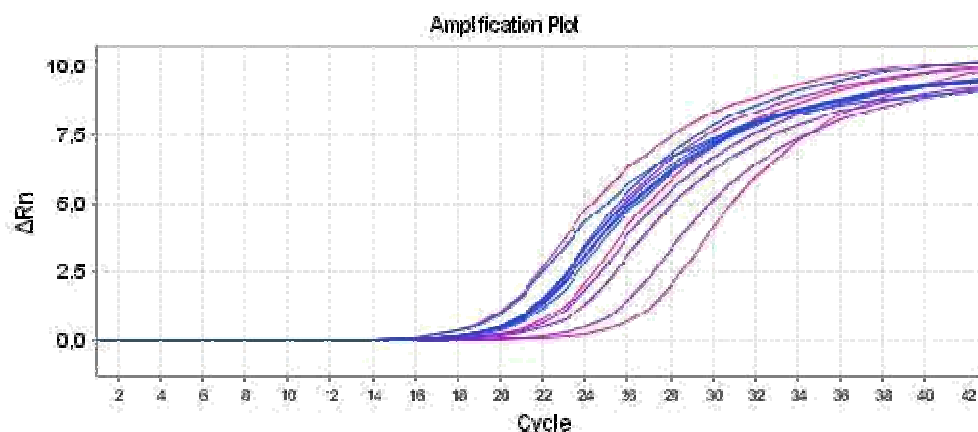
## **IV. RESULTADOS**

En el presente estudio se tuvo por objetivo analizar la cinética de expresión del ARNm de las citoquinas ROR $\gamma$ t y IL-17 en alpacas clínicamente sanas. ROR $\gamma$ t e IL-17 regulan de forma constante el desempeño patogénico de la respuesta inmune de mucosas en el intestino frente a la inflamación, así como también poseen un rol no patogénico en la defensa contra patógenos oportunistas de origen fúngico o bacteriano (Stockinger y Omenetti, 2017).

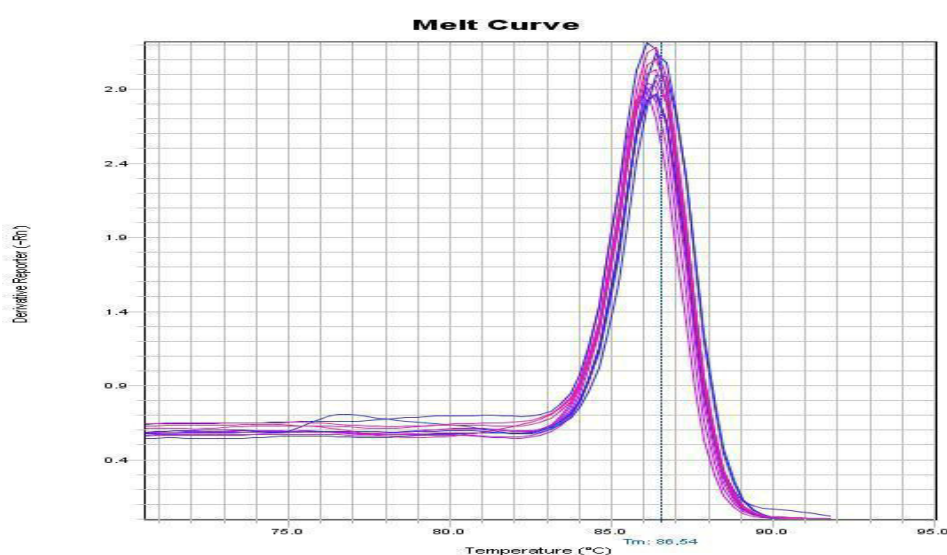
El estudio ha identificado características cinéticas particulares en las citoquinas evaluadas previamente no descritas en camélidos sudamericanos, observándose la expresión de ROR $\gamma$ t desde el nacimiento y con un leve aumento constante a medida que aumenta la edad, mientras que la expresión de IL-17 se elevó marcada y ascendentemente del primer al tercer grupo etario. La expresión de ROR $\gamma$ t es detectada en la fase intermedia de la diferenciación Th17, después de la inducción de factores transcripcionales claves de células Th17. Sin embargo, los niveles proteicos de ROR $\gamma$ t solo se incrementan en la fase tardía de la diferenciación cuando los ARN mensajeros que codifican las citoquinas características de células Th17 son inducidos.

### **4.1 Expresión de GAPDH**

Se analizó la expresión del gen GAPDH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) usado como control interno o endógeno demostrando que todas las muestras obtenidas expresaron este gen. Los valores Ct (Ciclo Threshold o Ciclo umbral) variaron dentro de un rango de 16.5 y 22.5 (Figura 5). Los valores de Tm (Temperatura de melting o disociación) tuvieron un rango de 84.3 a 86.54 °C (Figura 6), demostrando la amplificación de un producto único y específico.



**Figura 5.** Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 16.5 a 22.5.

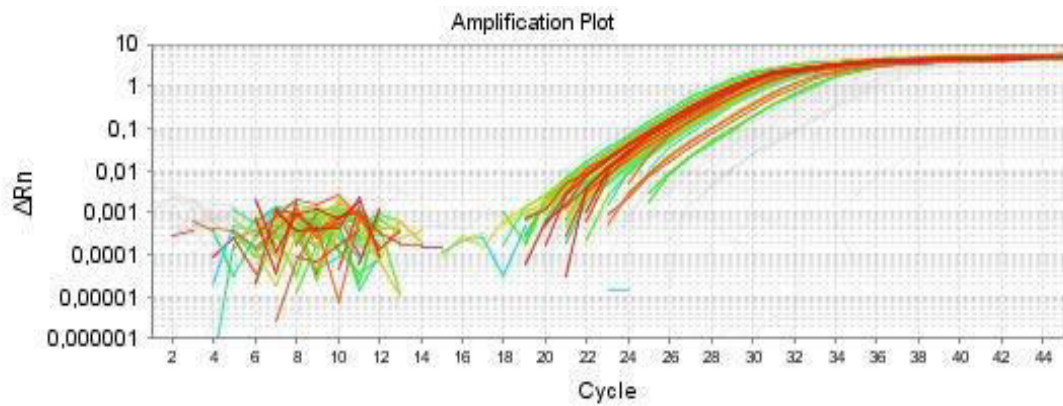


**Figura 6.** Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de Tm oscilaron entre 84.3 a 86.54 °C.

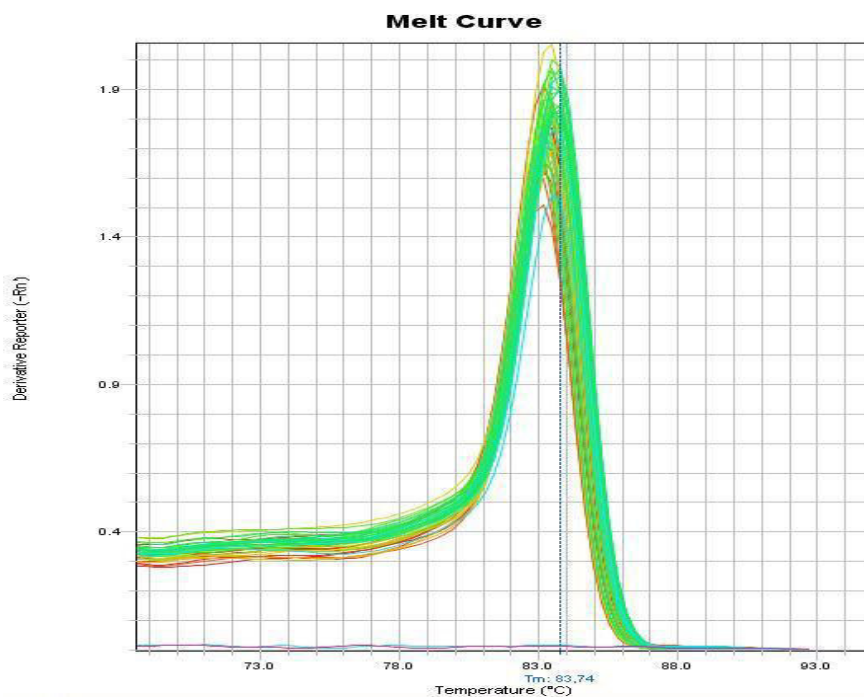
## 4.2 Expresión de ROR $\gamma$ t

Se observa una expresión ascendente del gen de ROR $\gamma$ t en las primeras semanas de vida, alcanzando un pico máximo en los animales del grupo 1 para luego disminuir ligeramente en los animales del grupo 2. Los valores Ct varían dentro de un rango de 24.5 a 28.2 (Figura 7). Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los

83.07 a 83.59 °C (Figura 8) demostrando la amplificación de un producto único y específico.

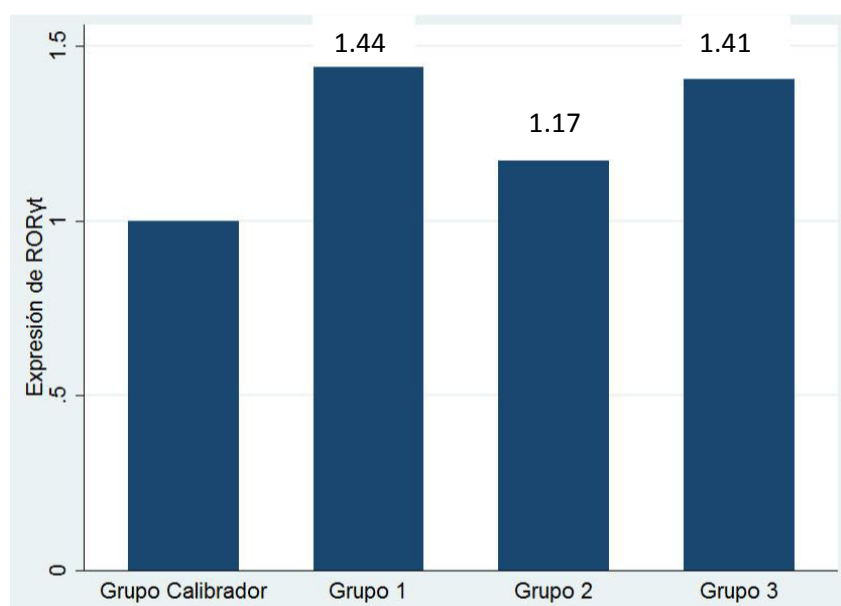


**Figura 7.** Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para ROR $\gamma$ t en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 24.5 a 28.2.



**Figura 8.** Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen ROR $\gamma$ t en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de Tm oscilaron entre 83.07 a 83.59 °C.

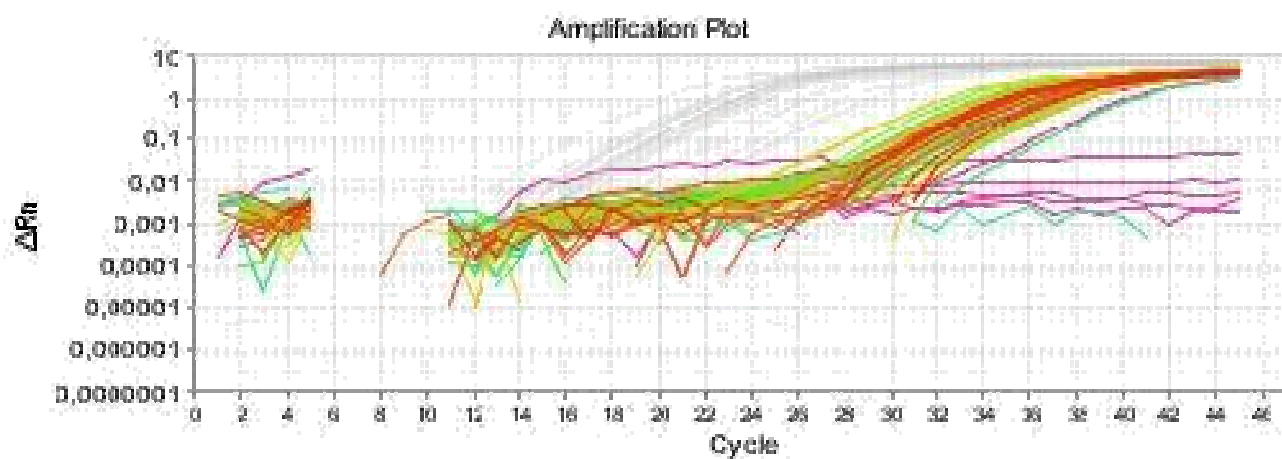
La cuantificación relativa de la expresión del gen ROR $\gamma$ t mostró que los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente expresaron  $1.44 \pm 0.36$ ,  $1.17 \pm 0.75$  y  $1.41 \pm 1.22$  veces este gen con respecto al grupo calibrador (Figura 9). La prueba de ANOVA de una vía concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en ninguno de los grupos etarios. La prueba de Bonferroni señala que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos etarios.



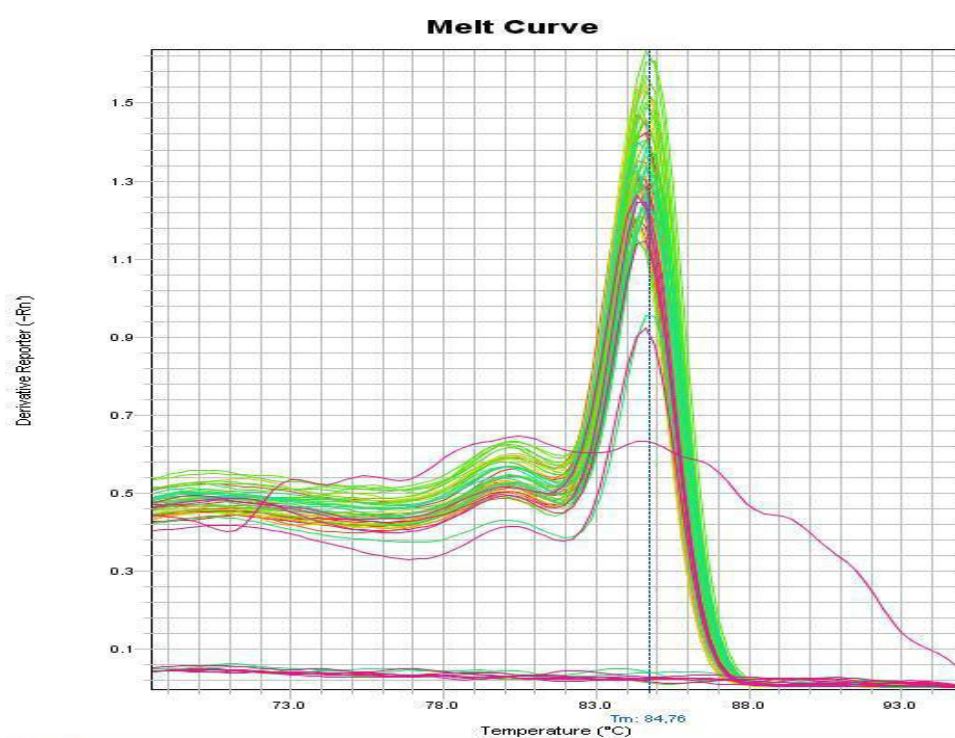
**Figura 9.** Niveles de expresión de ROR $\gamma$ t en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Cada barra representa la media de la expresión de los grupos etarios evaluados.

### 4.3 Expresión de IL-17

Se observa una expresión ascendente del gen de IL-17 desde las primeras semanas de vida, alcanzando un pico máximo en los animales del grupo 3. Los valores Ct varían dentro de un rango desde 28.4 a 36.7 (Figura 10). Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los 77.8 a 84.7 °C (Figura 11) demostrando la amplificación de un producto variable.

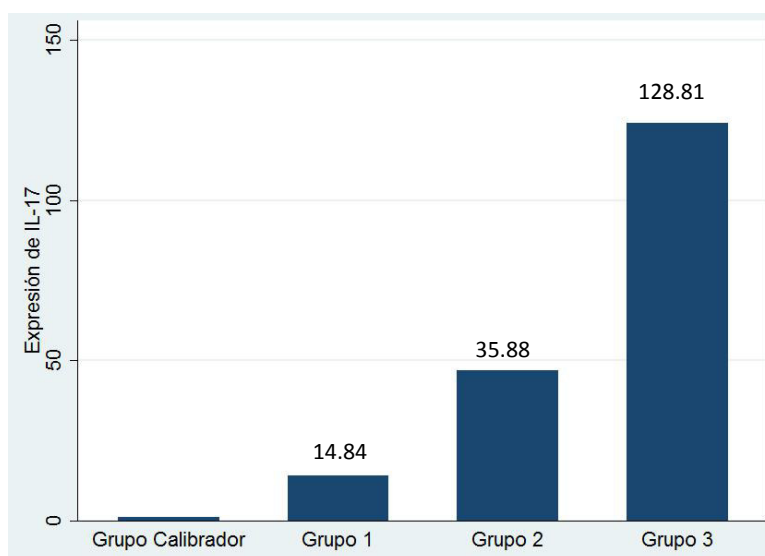


**Figura 10.** Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 28.4 a 35.5.



**Figura 11.** Curvas de disociación ( $T_m$ ) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los valores de  $T_m$  oscilaron entre 77.8 a 84.7 °C

La cuantificación relativa de la expresión del gen de IL-17 mostró que los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente expresaron  $14.84 \pm 13.72$ ,  $35.88 \pm 22.18$ ,  $128.81 \pm 142.20$  veces este gen con respecto al grupo calibrado. La prueba de Kruskal – Wallis concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en ninguno de los grupos etarios. La comparación múltiple usando la prueba de U Mann – Whitney señala que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos etarios (Figura 12).



**Figura 12.** Niveles de expresión de IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Cada barra representa la media de la expresión de los grupos etarios evaluados.

## V. DISCUSIÓN

Es beneficioso tener secuenciados los genes de ROR $\gamma$ t e IL-17 así como otras citoquinas del sistema inmune de alpacas en el Genbank, esto nos permitió diseñar los oligonucleótidos cebadores, logrando amplificar productos de un tamaño adecuado para la técnica de PCR en tiempo real. Los productos amplificados tuvieron un tamaño de 201 pb (GAPDH), 203pb (RORC) y 200pb (IL-17A) como se predijo al diseñar los cebadores. Se comprobó la especificidad de los productos amplificados al existir concordancia con sus respectivos valores de temperatura de disociación ( $T_m$ ) de los productos finales establecidos previamente, a excepción de IL-17.

Los valores de  $T_m$  de los productos amplificados tuvieron valores que oscilan entre 84.3 a 86.5 ° C para GAPDH (Figura 6), 83 a 83.5° C para ROR $\gamma$ t (Figura 8) y 77.8 a 84.7 ° C para IL-17 (Figura 11). Cabe resaltar que la temperatura de disociación se ve influenciada por el contenido de GC (Guanina-Citosina), tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos (Ririe *et al*, 1997).

En este trabajo los  $T_m$  de IL-17 fueron las de mayor variación. Es posible que estas diferencias sean resultados de las variaciones polimórficas o isoformas del gen, debido a que está encontrándose muchas isoformas de esta citoquina y que en la actualidad se indica que existe una familia de proteínas similares en conformación y secuencias aminoacídicas (Aggarwal y Gurney, 2002), pero el presente trabajo no puede establecer con certeza la existencia de polimorfismos o isoformas procedentes de mecanismos de recombinación génica propias de la generación de ARNm de esta citoquina estudiada. Es necesaria la realización del secuenciamiento nucleotídico de los productos del RT-PCR

tiempo real para identificar tales variaciones y emplear técnicas avanzadas para develar las implicancias de tales cambios y sus efectos sobre los individuos en caso se presenten.

La combinación del manejo y los factores ambientales al que están expuestos los animales en estudio promueve la presentación de la cinética de expresión de las citoquinas observadas. Los animales en estudio han sido criados en condiciones semi intensivas, siendo el muestreo realizado en épocas de parición y empadre, condicionado un alto movimiento de animales entre los rebaños y susceptibilidades fisiológicas de las madres y crías. Además, este período coincide con las altas temporadas de lluvia, favoreciendo el crecimiento de los pastos y la proliferación de potenciales patógenos productores de alteraciones entéricas como *Clostridium perfringens* (Pérez et al, 2012), *Eimeria* spp. (Rodríguez et al, 2012), *Cryptosporidium parvum* (Palacios, 2008; Villacorta et al, 2009), *E. coli* (Luna et al, 2012; Mori et al, 2014), *Giardia* spp (Gomez-Couso et al, 2012; Gomez-Puerta et al, 2014), Rotavirus (Morales et al, 2007) y Betacoronavirus 1 (Luna et al, 2015) que estimulan la respuesta inmune innata y adaptativa.

Además, la expresión de ROR $\gamma$ t no es estabilizada por bucles de retroalimentación positiva, lo cual hace más sensible a cambios ambientales y puede permitir el cambio de células Th17 a linajes Th alternativos (Ciofani *et al*, 2012). Entre las criptas intestinales y la lámina propia del intestino delgado se encuentran pequeños grupos de células linfoides (criptoparches) que contienen dos tipos de células, 20 al 30% de estas células son células dendríticas CD11c<sup>+</sup>, la mayoría de estas células se asemejan a precursores tempranos de células T, expresan cKIT, cadena  $\alpha$  del receptor de IL-7, THY1 y CD44, pero no TCR. En Los ratones estas células linfoides aparecen 1 a 2 semanas después del nacimiento y se encuentra cerca de 1500 criptoparches en el intestino delgado de adultos. Estos se desarrollan independientemente de la flora intestinal, y también independientemente de las células B y T. Tanto los timocitos doblemente positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) como las células de estos criptoparches (Lin-cKIT<sup>+</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) son únicas en expresar el receptor hormonal nuclear ROR $\gamma$ t (Eberl, 2005).

El análisis de ARNm de ROR $\gamma$ t manifestó un patrón de expresión continuo desde el nacimiento estando el valor máximo en el primer grupo, descendiendo ligeramente en el segundo grupo y manteniéndose elevado en el tercer grupo etario. Esto permite que las células Th17 e ILC3 expresen IL-17 rápidamente. Esto es compatible con las funciones



de ROR $\gamma$ t, el cual participa expresándose en células linfoides innatas tipo 3 (ILC3) y varios subgrupos de células T como las células Th17, células NKT invariantes, células T  $\gamma\delta$  y un subgrupo de neutrófilos productores de IL-17 documentado en humanos y ratones (Eberl, 2016) con el fin de inducir el desarrollo de tejidos linfoides en el feto y después del nacimiento en la lámina propia intestinal y activación de células B, debido a que la cría de alpaca necesita desarrollar folículos linfoides aislados, placas de Peyer y linfonódulos durante las primeras semanas de vida con el fin de iniciar una respuesta inmune innata guiada por la estimulación de neutrófilos para la defensa contra múltiples bacterias patógenas extracelulares y hongos localizados en el nicho ecológico con el cual entran en contacto, presentando este una alta carga de patógenos.

En contraste al número de células T ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, el número absoluto de ILCs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> no se vio afectado en ratones libres de gérmenes, los cuales mostraron que el desarrollo de ILCs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> es programado (Sawa *et al*, 2010). Este resultado podría ser contraintuitivo, ya que ROR $\gamma$ t es inducido en células Th17 en desarrollo mediante la activación de STAT3 (Harris *et al*, 2007; Mathur *et al*, 2007). Hay un enriquecimiento de las células Th17 en el intestino (Lochner *et al*, 2008), donde los activadores de STAT3 tales como IL-6, IL-21 e IL-23 abundan, presuntamente en respuesta a grandes comunidades microbianas residiendo en el lumen intestinal.

La microbiota también induce la generación del subgrupo NK1.1<sup>lo-neg</sup> de células ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> NKp46<sup>+</sup> (Satoh-Takayama *et al*, 2008; Sanos *et al*, 2009; Luci *et al*, 2009). Se ha demostrado que la microbiota y la inmunidad adaptativa reprimieron la actividad de las ILCs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>. Es posible que las células T ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, incluyendo las células Th17, repriman a las ILCs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> mediante competición por un nicho de citoquinas común. Ya que ambos tipos de células expresan tanto IL-17 como IL-22, estas podrían estar sujetas a similares regulaciones por un panel de citoquinas que incluyen IL-6, IL-21, IL-23, IL-25 e IL-27 (Dong, 2008)

Los resultados obtenidos de ROR $\gamma$ t pueden asociarse a una respuesta inmunológica transitoria debido a la presencia de nuevos antígenos alimenticios y microbiológicos generando un descenso en la expresión de esta a partir de la segunda semana. Resultados similares pueden apreciarse en otros trabajos donde se estudia la expresión de citoquinas de los grupos Th1 y Th2 en la mucosa intestinal de alpacas durante el primer mes de vida,

donde también refleja un aumento de la respuesta inmune en las primeras semanas de vida para luego mostrar un ligero descenso (Burga, 2016; Chiok, 2012; More *et al*, 2011). Sin embargo, IL-17 no sigue este patrón, mostrando una expresión ascendente con la edad, asociándose esto a la gran cantidad de agentes patógenos a los cuales se enfrentan las crías de alpaca durante el primer mes de vida bajo las condiciones en las que son criadas.

La expresión de IL-17 en este estudio mostró una expresión ascendente con la edad, alcanzando su máxima expresión en los animales del grupo 3. La expresión mostró valores de 14.19, 46.84 y 124.06 veces este gen con respecto al grupo calibrador para los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente). En múltiples estudios esto se puede deber principalmente a la exposición de las crías a una gran cantidad de bacterias extracelulares como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida albicans*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis* (Chen y Kolls, 2013).

La variabilidad de la expresión de este gen en las crías nos muestra que la población es infectada en diferentes tiempos por estos patógenos presentes en el medio ambiente y que conducen a cuadros inflamatorios recurrentes. Niveles de suero de IL-17 se correlacionan positivamente con los niveles en la neutrofilia en ratones deficientes de moléculas de adhesión de leucocitos, IL-17 estimuló la expresión de neutrofilia dependiente de G-CSF al ser expresada en ratones (Stark *et al*, 2005). La activación de receptores para IL-17 sobre las células epiteliales y fibroblastos estimula la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiotácticas que regulan el reclutamiento de neutrófilos a tejidos infectados o inflamados. Sin embargo, la infiltración con población neutrofílica descrita exacerba la respuesta inflamatoria mediante la producción de radicales de oxígeno altamente reactivos mediado por IL-17 y su receptor, los radicales no poseen solo actividad antimicrobiana, sino que probablemente también actividad citotóxica destructiva (Taylor *et al*, 2013). Mientras que el rol esencial de IL-17A en la protección contra infecciones primarias causadas por una variedad de bacterias extracelulares y hongos ha sido documentado por varios años, el rol de las respuestas inmunes adaptativas mediadas por células Th17 antígeno específicas ha sido investigado más recientemente. El desarrollo de células Th17 de memoria antígeno específicas podría beneficiar al

hospedero mediante el desarrollo de una respuesta de memoria específica del patógeno más robusta hasta el reasentamiento del mismo patógeno. Por lo tanto, las células Th17 poseen una ventaja como fuente de IL-17A como fuentes innatas de IL-17A ya que las células T  $\gamma\delta$  e ILC3 no activan una respuesta inmunológica de memoria típica (Chen y Kolls, 2017).

La expresión de IL-17 ascendente con la edad en el estudio puede estar relacionada a que ROR $\gamma$ t no sería el único factor de transcripción involucrado en la expresión de esta citoquina. Estudios han demostrado un rol crítico de STAT3 (Mathur *et al*, 2007) y RORC (Ivanov *et al*, 2006) en el desarrollo del linaje de células Th17 en ratones y humanos. La proteína Runx1 puede regular la transcripción en una manera dependiente de contexto mediante la unión a otros factores transcripcionales para formar co activadores o complejos co-represores. Runx1 actúa no solo junto a ROR $\gamma$ t previamente sintetizado sino también induce nueva síntesis de ROR $\gamma$ t (Zhang *et al*, 2008). IL-6 es esencial en el proceso de activar transductores de señal y activadores de la transcripción 3 (STAT3), el cual directamente activa ROR $\gamma$ t. STAT3 también suprime a la expresión de la caja tipo cabeza de tenedor P3 inducido por TGF- $\beta$  (FOXP3) y por lo tanto inhibe la diferenciación CD4<sup>+</sup> Th hacia el linaje celular T regulatorio (Treg) (Mangan *et al*, 2006; Veldhoen *et al*, 2006).

Otro receptor nuclear del ácido retinoico relacionado, ROR $\alpha$ , es también expresado en células Th17 tanto *in vitro* como *in vivo*. La expresión de ROR $\alpha$  es inducida por TGF- $\beta$  e IL-6 mediante la vía STAT3. Las células T CD4<sup>+</sup> deficientes en *Rora* poseen una diferenciación alterada de Th17, pero no totalmente eliminada. Interesantemente, la deficiencia de ROR $\alpha$  daña la expresión de IL-17A, pero no de IL-17F (Ivanov *et al*, 2007). La co-sobre expresión de ROR $\alpha$  y ROR $\gamma$  incrementa significativamente la diferenciación de Th17. Estos resultados sugieren que ROR $\alpha$  es un factor de transcripción que sinergiza la función de ROR $\gamma$ t, pero no es esencial para la diferenciación de Th17 (Chu *et al*, 2008). Otros estudios han demostrado que múltiples factores de transcripción también participan en la regulación del desarrollo de células Th17. Estas incluyen IRF4, BATF, y RUNX1 (Kurebayashi *et al*, 2000). Durante la diferenciación de células Th17, hasta la señalización TCR, los llamados factores pioneros, BATF e IRF4, se unen a la región promotora del gen *Il17a* y al estimulador regulatorio en múltiples sitios (Sahoo *et al*, 2015; Huber y Lohoff, 2014). La señalización de IL-6 recluta STAT3, BATF, IRF4 y el complejo

STAT3 junto al co-activador p300 acetiltransferasa histona para promover la expresión de *Rorc* (Huber y Lohoff, 2014).

Además, se debe tener en cuenta la influencia de factores inmunoestimuladores como el calostro, el cual brinda a las alpacas (las cuales de por sí nacen muy vulnerables e hipogammaglobulinémicas debido a la placentación epiteliocorial difusa que poseen los camélidos) la principal fuente de protección contra patógenos en neonatos al contener principalmente Ig G (Whitehead, 2009). Factores de protección inespecíficos como lisozimas, lactoferrina, complemento (Fernández *et al*, 1994) y células inmunes maternas viables incluyendo linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos que realizan la función de estimular el desarrollo inmunológico (Le Jan, 1996).

En este estudio, el análisis de la expresión de ARNm del factor transcripcional ROR $\gamma$ t y de la citoquina IL-17, las cuales fueron detectados en los primeros días de vida demuestra que existe un sistema inmune ya desarrollado y capaz de montar una respuesta inmune desde el nacimiento. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Roca en el 2014, teniendo en cuenta la función de organogénesis linfoide de ROR $\gamma$ t, donde se evidencia la presencia de tejido linfoide asociado a mucosa intestinal anterior al nacimiento tanto en yeyuno, como en íleon de alpacas, siendo las placas de Peyer ileales las que sufren una involución y las placas de Peyer yeyunales las que persisten durante toda la vida del animal, siendo ambas activas post nacimiento.

## **VI. CONCLUSIONES**

- La expresión de ROR $\gamma$ t en crías de alpacas clínicamente sanas se mostró constante y ascendente durante la primera y tercera semana de vida, alcanzando su máxima expresión en el grupo de animales de 21 a 47 días de edad estudiado.
- La expresión de IL-17 en crías de alpaca clínicamente sanas manifestó una expresión progresiva con la edad, alcanzando su máximo valor en los animales de 26 a 47 días de edad estudiado.

## **VII. SUGERENCIAS**

- Evaluar los patrones cinéticos de expresión de los factores de transcripción FOXP3, STAT3; así como de las citoquinas IL-22 e IL-23 con el fin de tener un perfil de expresión más completo del linaje Th17 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas y compararlos con crías enfrentadas a antígenos de patógenos bacterianos extracelulares.
- Identificar y cuantificar la presencia de células productoras de IL-17 e IL-22, como las ILC3, LT<sub>i</sub>, células NK invariantes y células  $\gamma\delta$  en mucosa intestinal de crías de alpaca mediante un análisis inmunohistoquímico o de citometría de flujo, con el objetivo de analizar su influencia en la respuesta inmune.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta-Rodríguez E, Napolitani V, Lanzavecchia G, Sallusto F. 2007. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology* 8(9): 942-9.
2. Adachi S, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S. 1997. Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo. *International Immunology* 9: 507-514.
3. Aggarwal S, Gurney A. 2002. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* January 2002 71:1-8
4. Akimzhanov AM, Yang XO, Dong C. 2007. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 282: 5969-5972.
5. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. 1999. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes synergistic or antagonist effects with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 162: 494-502.
6. Alimzhanov BM, Kuprash VD, Kosco-Vilbois HM, Luz A, Turetskaya LR, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov AS, Pfeffer K. 1997. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin  $\beta$ -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (17): 9302-9307.
7. Amatya N, Garg VA, Gaffen LS. 2017. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends in Immunology* 38 (5): 310-322.
8. Ameghino E, De Martini J. 1991. Mortalidad de crías de alpacas. Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Lima. 128 p.

9. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. 1999. NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17, TNF-alpha, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 162: 5337-5344.
10. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in human intestine. *Science* 307: 1915-1920.
11. Bar E, Whitney PG, Moor K, Reis e Sousa C, Leibund Gut-Landmann S. 2014. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity*, 40: 117-127.
12. Bardález C, Manchego S, Chiok LK, Sandoval C, More B. Danilo Pezo C, Ramírez V. 2013. Cinética de expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 24(3): 381-389.
13. Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF. 1993. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 1371-1379.
14. Belknap E, Collins J, Larsen R, Conrad K. 2000. Bovine viral diarrhea virus in New World camelids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12: 568-570.
15. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom BT, Oukka M, Weiner LH, Kuchroo KV. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
16. Burga CC. 2016. Expresión de citoquinas de la respuesta Th2 en mucosa intestinal de crías de alpaca. Tesis para optar por el grado académico de magíster en ciencias veterinarias con mención en salud animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima. Perú.
17. Bustinza JA. 2000. Enfermedades de alpacas. 2º ed. Arequipa: Universidad del Altiplano. 346 p.
18. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine* 197(4): 403-11.
19. Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-Andre M. 1994. RZR $\alpha$ s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol* 8: 757-770.



20. Carlberg C, Wiesenberg I. 1995. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J. Pineal. Res.* 18: 171-178.
21. Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. 2003. Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *Journal of American Veterinary Medicine Association.* 223: 1806-1808.
22. Cebra CK, Anderson ED, Tibary A, Van Saun JR, Johnson WLR. 2014. Llama and alpaca care. 1<sup>st</sup> ed. Canada: Elsevier. 833 p.
23. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosa immunity. *Nature* 457 (7230): 722-5.
24. Chang SH, Park H, Dong C. 2006. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J. Biol. Chem.* 281: 35603-35607.
25. Chang SH, Dong C. 2011. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cell Signal* 23 (7): 1069-75.
26. Chen Q, Yang W, Gupta S, Biswas P, Smith P, Bhagat G, Pernis BA. 2008. IRF-4 binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor. *Immunity* 29 (6): 899-911.
27. Chen K, Kolls JK. 2013. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annu Rev Immunol* 31: 605-33.
28. Chen K, Kolls JK. 2017. Interleukin-17A(IL-17A). *Gene* 614: 8-14.
29. Chiok KL. 2012. Expresión de citoquinas de las respuestas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis para optar por el grado académico de magíster en ciencias veterinarias con mención en salud animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima. Perú.
30. Chiricozzi A, Nogales EK, Johnson.Huang ML, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Bonifacio MK, Gulati N, Mitsui H, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Krueger GJ. 2014. IL-17 induces and expanded range of downstream genes in reconstituted human epidermis model. *PLoS ONE* 9 (2): e90284.
31. Chu H, Mazmanian KS. 2013. Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nature Immunology* 14: 668-675.

32. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR. 2012. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151 (2): 289-303.
33. Crispin CM. 2008. Productividad y distribución de fibra de alpaca en la región de Huancavelica: un análisis comparativo entre Huancavelica y Puno. Tesis EAP Economía. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
34. Cua DJ, Tato CM. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 10 (7): 479-89.
35. Cyster JG, Dang EV, Reboldi A, Yi T. 2014. 25-Hydroxysteroids in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 14: 731-743.
36. DeJardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR. 2002. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17 (4): 525-35.
37. Dionisio CJ, Manchego SA, Chiok KL, Sandoval CN, More BJ, Pezo CD, Rivera GH. 2014. Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 25(2): 151-161.
38. Dong C. 2008. Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews Immunology* 8 (5): 337-48.
39. Eberl G, Littman DR. 2003. The role of the nuclear hormone receptor RORgamma in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunol. Rev.* 195: 81-90.
40. Eberl G, Littman DR. 2004. Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgamma<sup>+</sup> cells. *Science*, 305 (5681): 248-51.
41. Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. 2004. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nature Immunology* 5(1): 64-73.
42. Eberl G. 2005. Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway. *Nature Reviews Immunology* 5: 413-420.
43. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. 2015. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science* 348 (6237): aaa6566.

44. Eberl G. 2016. ROR $\gamma$ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunology* 10: 27-34.
45. Eyerich K, Foerster S, Rombold S, Seidl HP, Behrendt H, Hofmann H, Ring J, Traidl-Hoffmann C. 2008. Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-Associated Cytokines IL-17 and IL-22. *Journal of Investigative Dermatology* 128 (11): 2640-2645.
46. Eyerich K, Dimartino V, Cavani A. 2017. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *European Journal of Immunology* 47: 607-614.
47. FAO. 2005. Situación actual de los Camélidos Sudamericanos en Perú. Proyceto de Cooperación Técnica a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región-Andina. Prólogo TCP/RLA/2914.
48. Fernández AS, Padola NL, Esterin SM. 1994. El calostro, fuente de transferencia de la inmunidad materna. *Ciencia y Veterinaria Córdoba*, 22.
49. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311: 83-87.
50. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebechque S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183 (6): 2593-603.
51. Fowler ME. 1998. Medicine and surgery of South American camelids. 2<sup>a</sup> ed. Iowa: Iowa State University Press. 166-169 p.
52. Fukata M, Breglio K, Chen A, Vamedevan AS, Goo T, Hsu D, Conduah D, Xu R, Abreu MT. 2008. The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4<sup>+</sup> T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease. *The Journal of Immunology* 180(3): 1886-94.
53. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. 2014. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews Immunology* 14 (9): 585-600.
54. Gao W, Wu Y, Tian Y, Ni B. 2015. Yin-Yang regulation of ROR $\gamma$ t protein complex in Th17 differentiation. *Int. Rev. Immunol.* 34: 295-304.
55. Geissmann F, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82.

56. Genova GS, Streeter NR, Simpson MK, Kapil S. 2008. Detection of an antigenic group 2 coronavirus in an adult alpaca with enteritis. *Clinical and Vaccine Immunology* 15(10): 1629-1632.
57. Gómez-Couso H, Ortega-Mora L, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza L, Zanabria-Huisa V, Pedraza-Díaz S. 2012. Presence and molecular characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Vet Parasitol* 187: 414-420.
58. Gómez-Puerta LA, Lopez-Urbina MT, Alarcon V, Cama V, Gonzales AE, Xiao L. 2014. Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in alpacas in the Andean region. *Parasitology International* 63 (1): 31-34.
59. Gonnella AP, Chen Y, Inobe J, Komagata Y, Quartulli M, Weiner LH. 1998. In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *The Journal of Immunology* 160: 4708-4718.
60. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15 (2): 103-113.
61. Gu C, Wu L, Li X. 2013. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64 (2): 477-485.
62. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. 2007. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in Th17 development and Th17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179 (7): 4313-7.
63. He YW, Deftos ML, Ojala EW, Bevan MJ. 1998. ROR $\gamma$ t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* 9: 797-806.
64. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R, Mantegazza AR, Ma HL, Crawford A, Angelosanto JM, Wherry EJ, Koni PA, Bushman FD, Elson CO, Eberl G, Artis D, Sonnenberg GF. 2013. Innate lymphoid cells regulate CD4<sup>+</sup> T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 498 (7452): 113-7.
65. Herrera RA. 2012. Detección de citoquinas inductora y efectora para la diferenciación y función de linfocitos colaboradores 17 (Th17) en mucosa

intestinal de crías de alpaca (Vicugna pacos). Tesis para optar por el Título Profesional de Médico Veterinario, FMV-UNMSM (Lima-Perú). 98 pp.

66. Holmgren J, Czerkinsky C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* 11: 45-53.
67. Huber M, Lohoff M. 2014. IRF4 at the crossroads of effect T-cell fate decision. *European Journal of Immunology* 44 (7): 1886-1895.
68. Huh YS, Rifas-Shiman LS, Taveras ME, Oken E, Gillman WM. 2011. Timing of solid food introduction and risk of obesity in preschool-aged children. *Pediatrics* 127 (3): e544-e551.
69. INEI. 2012. Resultados definitivos III Censo Nacional Agropecuario CENAGRO.
70. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. 2011. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *Journal of Autoimmunity* 60: 1-11.
71. Ivanov II, McKenzie SB, Zhou L, Tadakoro EC, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua JD, Littman RD. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 126: 1121-1133.
72. Ivanov II, Zhou L, Littman DR. 2007 Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 19 (6): 409-17.
73. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139 (3): 485-98.
74. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-162.
75. Jetten AM. 2004. Recent advances in the mechanisms of action and physiological functions of the retinoid-related orphan receptors (RORs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3(4): 395-412.
76. Jianjun Y, Zhang R, Shen Y, Peng L, Zhu C, Cui M, Wang W, Arnaboldi P, Tang M, Gupta M, Qi CF, Jayaraman P, Jiang B, Chen SH, He JC, Ting AT, Zhou MM, Kuchroo VK, Morse HC 3<sup>rd</sup>, Ozato K, Sikora AG, Xiong H. 2013. T-cell derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* 210 (7): 1447-62.

77. Johnson WLR. 2016. Overview of llamas and alpacas [Internet], Disponible en: <http://www.msdsvetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/llamas-and-alpacas/overview-of-llamas-and-alpacas>
78. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol.* 160 (7): 3513-21.
79. Kadwell M, Fernández M, Stanley H, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 2575-2584.
80. Kathania M, Khare P, Zeng M, Cantarel B, Zhang H, Ueno H, Venuprasad K. 2016. Itch inhibits IL-17 mediated colon inflammation and tumorigenesis by ROR- $\gamma$ t ubiquitination. *Nature Immunology* 17: 997-1004.
81. Kelsall BL, Strober W. 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *Journal of Experimental Medicine* 183(1): 237-47.
82. Keijsers RR, Joosten I, van Erp EP, Koenen JH, van de Kerkhof CP. 2014. Cellular sources of IL-17 in Psoriasis: A paradigm shift?. *Experimental Dermatology* 23 (11): 799-803.
83. Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, Rho J, Wong BR, Josien R, Kim N, Rennert PD, Choi Y. 2000. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *Journal of Experimental Medicine* 192 (10): 1467-78.
84. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. 2000. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118: 1001-1011.
85. Klose NSC, Kiss AE, Schwierzeck V, Ebert K, Hoyler T, d'Hargues Y, Göppert N, Croxford LA, Waisman A, Tanriver Y, Diefenbach A. 2013. A t-bet gradient controls the fate and function of CCR6<sup>-</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Nature* 494: 261-265.
86. Komai-Koma M, Jones L, Ogg SG, Xu D, Liew YF. 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 3029-3034.

87. Kruglov AA, Grivennikov IS, Kuprash VD, Winsauer C, Prepens S, Seleznik MG, Eberl G, Littman RD, Heikenwalder M, Tumanov VA, Nedospasov AS. 2013. Nonredundant function of soluble LT $\alpha$ 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* 342 (6163): 1243-1246.
88. Kumar P, Monin L, Castillo P, Elsegeiny W, Horne W, Eddens T, Vikram A, Good M, Schoenborn AA, Bibby K, Montelaro RC, Metzger DW, Gulati AS, Kolls JK. 2016. Intestinal interleukin-17 receptor signaling mediates reciprocal control of the gut microbiota and autoimmune inflammation. *Immunity* 44 (3): 659-71.
89. Kurebayashi S, Ueda E, Sakaue M, Patel DD, Medvedev A, Zhang F, Jetten MA. 2000. Retinoid-related orphan receptor  $\gamma$  (ROR $\gamma$ ) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10132-10137.
90. Le Jan C. 1996. Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. *Veterinary research* 27 (4-5): 403-417.
91. LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky SD, Weinberg BJ, Vail PT, Guilak F. 2001. Interleukin-1, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis & Rheumatism* 44 (9): 2078-2083.
92. Leonardi A, Chariot A, Claudio E, Cunningham K, Siebenlist U. 2000. CIKS, a connection to Ikappa B kinase and stress-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10494-10499.
93. Lipp M, Müller G. 2004. Lymphoid organogenesis: getting the green light from ROR $\gamma$ t. *Nature Immunology* 5 (1): 12-14.
94. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adam JS, Bloom BR, Modlin RL. 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311(5768): 1770-3.
95. Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulácsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, Grimaldo RM, Blancas-Galicia L, Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle C,

- Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamente J, Bué M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE, Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Maródi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL. 2011. Gain of function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 208 (8): 1635-48.
96. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods* 25: 402-408.
97. Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, Riethmacher D, Si-Tahar M, Di Santo PJ, Eberl G. 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> and regulatory IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T cells. *Journal of Experimental Medicine* 205 (6): 1381-1393.
98. Long K, Rosado J, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, DuPont H, Nanthakumar NN, Estrada-Garcia T. 2010. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infection and Immunity* 78: 1221-1228.
99. Luci C, Reynders A, Ivanov II, Cognet C, Chiche L, Chasson L, Hardwigsen J, Anquiano E, Banchereau J, Chaussabel D, Dalod M, Littman DR, Vivier E, Tomasello E. 2009. Influence of the transcription factor ROR $\gamma$  on the development of NKp46<sup>+</sup> cell populations in gut and skin. *Nature Immunology* 10(1): 75-82.
100. Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012. Genotipificación, evaluación toxigénica in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23(3): 280-288.
101. Luna L, Brandão PE, Maturrano L, Rosadio R, Silva FDF, Soares RM, Gregori F. 2015. *Betacoronavirus* 1 in alpacas (*Vicugna pacos*) in the High Peruvian Andres. *Small Ruminant Research* 133: 7-9.
102. MacPherson AJ, Harris NL. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 4(6): 478-85.



103. Maitra A, Shen F, Hanel W, Mossman K, Tocker J, Swart D, Gaffen SL. 2007. Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (18): 7506-7511-
104. Maggi L, Santarlaschi V, Capone M, Peired A, Frosali F, Crome SQ, Querci V, Fambrini M, Liotta F, Levings MK, Maggi E, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. 2010. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *European Journal of Immunology* 40 (8): 2174-81.
105. Magri G, Miyajima M, Bascones S, Mortha A, Puga I, Cassis L, Barra CM, Comerma L, Chudnovskiy A, Gentile M, Llige D, Cols M, Serrano S, Aróstegui JI, Juan M, Yagüe J, Merad M, Fagarasan S, Cerutti A. 2014. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nature Immunology* 15 (4): 354-64.
106. Mangan RP, Harrington EL, O'Quinn BD, Helms SW, Bullard CD, Elson OC, Hatton DR, Wahl MS, Schoeb RT, Weaver TC. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage. *Nature* 444: 231-234.
107. Marín JC, Zapata B, Gonzales BA, Bonacic C, Wheeler JC, Casy C, Bruford M, Palma RE, Poulin E, Alliende MA, Spotorno EA. 2007. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 121-140.
108. Martin C, Pinto C, Cid M. 2010. Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4(1): 37-50.
109. Mathur AN, Change HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, Kapur R, Levy DE, Kansas GS, Kaplan MH. 2007. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol* 178 (8) 4901-7.
110. Mebius RE, Streeter PR, Michie S, Butcher EC, Weissman IL. 1996. A developmental switch in lymphocyte homing and permits CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells to colonize lymph nodes. *Proc. Natl Acad Sci USA* 93: 11019-11024.
111. Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. 1997. Developing lymph nodes collect CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>LTβ<sup>+</sup> cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7: 493-504.
112. Meijssen MAC, Brandwein SL, Reinecker HC, Bhan AK, Podolsky DK. 1998. Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *American Journal of Physiology* 274: G472-9.

- 113.Miossec P. 2003. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: If T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis & Rheumatism* 48 (3): 597-601.
- 114.Molina J. 1782. Saggio sulla storia naturale del Chili. Tommaso d'Aquino, Bologna, Italy. 306 p.
- 115.Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O, Bresnihan B. 2009. Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17<sup>a</sup> drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, oncostatin M and response to biologic therapies. *Arthritis Res. Ther.* 11 (4): R113.
- 116.More J. 2013. Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 104 pp.
- 117.Mori L, Perales R, Rodríguez J, Shiva C, Koga Y, Choquehuanca G, Palacios C. 2014. Molecular identification of Shiga-Toxin producing and enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in diarrheic and healthy young alpacas. *Advances in Microbiology* 4 (7): 5.
- 118.Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Boqunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, Merad M. 2014. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 343 (6178): 1249288.
- 119.Mowat MA. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology* 3: 331-341.
- 120.Müller PLS. 1776. Erste Classe, Saugende Thiere. In Des Ritters Carl von Linné vollstandiges Naturalsystem nach der zwolften Lateinischen Ausgabe. 1773-1776: pp 1-62 + 3 pis., Suppl., 384 pp, Register, 36 unnumbered pp. + 536 pp.
- 121.Neurath MF, Finott S, Glimcher LH. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosa immunity. *Nature Medicine* 8(6): 567-573.
- 122.Noster R, de Koning HD, Maier E, Prelog M, Lainka E, Zielinski CE. 2016. Dysregulation of proinflammatory versus anti-inflammatory human Th17 cell functionalities in the autoinflammatory Schnitzler syndrome. *Journal of Clinical Immunology* 138: 1161-1169.
- 123.Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubüser A, Eisenhaber F. 2003. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends Biochem. Sci.*, 28: 226-229.

124. Nowak R. 1991. Walker's mammals of the world. 5<sup>th</sup> ed. The John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA. 1362 p.
125. O'Connor WJr., Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK, Flavell RA. 2009. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature Immunology* 10 (6): 603-9.
126. Odbileg R, Lee S, Yoshida R, Chang KS, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. 2004. Cloning and sequence analysis of llama cytokines related to cell-mediated immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99(1-2):1-10.
127. Odbileg R, Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. 2005. Quantification of llama inflammatory cytokine mRNAs by Real-Time RT-PCR. *Journal of Veterinary Medical Science* 67: 195-198.
128. Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, Gaboriau-Routhiau V, Marques R, Dulauroy S, Fedoseeva M, Busslinger M, Cerf-Bensussan N, Boneca IG, Voehringer D, Hase K, Honda K, Sakaguchi S, Eberl G. 2015. Mucosal immunology The Microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$ <sup>+</sup> cells. *Science* 349 (6251): 989-93.
129. Onishi MR, Park JS, Hanel W, Allen WH, Maitra A, Gaffen LS. 2010. SEF/IL-17R (SEFIR) is not enough: An extended SEFIR domain is required for IL-17RA-mediated signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (43): 32751-32759.
130. Ortega J, Crossely B, Dechant JE, Drew CO, MacLachlan NJ. 2010. Fatal Bluetongue Virus Infection in an alpaca (*Vicugna pacos*) in California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22(1): 134-136.
131. Palacios CA. 2008. Estudio caso control del *Cryptosporidium* como factor de riesgo en la diarrea neonatal en alpacas menores a 15 días. Tesis para optar por el título de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
132. Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, López MT, Braga WU, Moro M. 2006. *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhea in Young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Veterinary Record* 158: 344-345.
133. Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A. 1998. Handbook of vertebrate immunology. 2nd ed. USA: Academic Press. 677 p.

134. Patil A, Hughes A, Zhang G. 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian  $\alpha$ -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 20: 1-11.
135. Pennino D, Eyerich K, Scarponi C, Carbone T, Eyerich S, Nasorri F, Garcovich S, Traidl-Hoffmann C, Albanesi C, Cavani A. 2010. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. *The Journal of Immunology*, 184 (9): 4880-4888.
136. Pérez D, Maturrano L, Rosadio R. 2012. Genotipificación y subtipificación molecular de cepas de *Clostridium perfringens* aisladas en alpacas muertas por enterotoxemia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23 (3): 272-279.
137. Powell N, MacDonald TT. 2017. Recent advances in gut immunology. *Parasite Immunology* 39 (6): e12430.
138. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110(2): 251-60.
139. Puel A, Cypowyj S, Bustamente J, Wright FJ, Liu L, Kyung Lim H, Migaud M, Israel L, Chrabieh M, Audry M, Gumbleton M, Toulon A, Bodemer C, El-Baghdadi J, Whitters M, Paradis T, Brooks J, Collins M, Wolfman MN, Al-Muhsen S, Galicchio M, Abel L, Picard C, Casanova JL. 2011. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332 (6025): 65-68.
140. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2): 229-41.
141. Ramírez A. 1991. Enfermedades infecciosas. En: Fernández-Baca S (ed). Avances y conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: FAO. 263-324 p.
142. Rennert DP, Browning LJ, Mebius R, Mackay F, Hochman SP. 1996. Surface lymphotoxin  $\alpha/\beta$  complex is required for development of peripheral lymphoid organs. *Journal of Experimental Medicine* 184: 1999-2006.
143. Rímac BR. 2015. Detección de cepas patógenas de *Escherichia coli* en alpacas neonatas y niños pastores. Tesis para optar por el título profesional de médico veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

144. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245 (2): 154-160.
145. Roca V, Manchego A, Sandoval N, Chiok KL, Rivera H. 2014. Caracterización histológica y dinámica linfóide de las placas de Peyer en crías de alpaca durante los 45 primeros días de vida. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(3): 341-349.
146. Rodríguez A, Casa E, Luna L, Gavidia C, Zanabria V, Rosadio R. 2012. Eimeriosis en crías de alpacas: prevalencia y factores de riesgos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23 (3): 289-298.
147. Rojas M, Manchego A, Rocha CB, Fornells LA, Silva RC, Mendes GS, Dias HG, Sandoval N, Pezo D, Santos N. 2016. Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern Peruvian highland. *J Infect Dev Ctries*. 31;10 (3): 269-74.
148. Rosadio R, Ameghino E. 1994. Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. *Veterinary Record* 135: 459-460.
149. Rosadio R. 2010. Mortalidad neonatal en alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.
150. Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. 2010. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Veterinary Parasitology* 168: 116-120.
151. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Luna E, Yaya K, Londoño P. 2012. Avances en el estudio de la patogénesis y prevención de la enterotoxemia de las alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23(3): 251-260.
152. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. 1993. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich Messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *The Journal of Immunology* 150 (12): 5445-56.
153. Sahoo A, Alekseev A, Tanaka K, Obertas L, Lerman B, Haymaker C, Clise-Dwyer K, McMurray SJ, Nurieva R. 2015. Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells. *Nature Communications* 6: 7997.
154. Salazar-Gonzales RM, Niess JH, Zammit DJ, Raindran R, Srinivasan A, Maxwell JR, Stoklasek T, Yadav R, Williams IR, Gu X, McCormik BA, Pazos MA, Vella AT, Lefrançois L, Reinecker HC, McSorley SJ. 2006. *Immunity* 24(5): 623-32.

155. Sanos LS, Bui LV, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johnner C, Diefenbach A. 2008. ROR $\gamma$ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46<sup>+</sup> cells. *Nature Immunology* 10: 83-91.
156. Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, Liotta F, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *European Journal of Immunology* 39 (1): 207-15.
157. Santori RF, Huang P, van de Pavert AS, Douglass Jr. FE, Leaver JD, Haubrich AB, Keber R, Lorbek G, Konijn T, Rosales NB, Horvat S, Rozman D, Rahier A, Mebius ER, Rastinejad F, Nes DW, Littman RD. 2015. *Cell Metab.* 21(2): 286-297.
158. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention JJ, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, Eber G, Di Santo JP. 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46<sup>+</sup> cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29 (6): 958-70.
159. Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, Di Santo JP, Eberl G. 2010. Lineage relationship analysis of RORgammat<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Science* 330: 665-669.
160. Sefik E, Geva-Zatorsky N, Oh S, Konnikova L, Zemmour D, McGuire AM, Burzyn D, Ortiz-Lopez A, Lobera M, Ghosts S, Earl A, Snapper SB, Jupp R, Kasper D, Mathis D, Benoist C. 2015. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> regulatory T cells. *Science* 349 (6251): 993-7.
161. Shen F, Li N, Gade P, Kalvakolanu DV, Weibley T, Doble B, Woodgett JR, Wood TD, Gaffen SL. 2009. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci Signal* 2 (59): ra8.
162. Smith B. 2001. Large animal internal medicine. 3rd ed. USA: Mosby Harcourt. 355-356 p.
163. Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, Istrate MA, Kamenecka TM, Roush WR, Vidović D, Schürer SC, Xu J, Wagoner G, Drew PD, Griffin PR, Burris TP. 2011. Suppression of Th17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 472 (7344): 491-4.

164. Spits H, Di Santo JP. 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* 12: 21-27.
165. Spits H, Artis D, Colonna M, Dieffenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powerie F, Vivier E. 2013. Innate lymphoid cells - a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* 13: 145-149.
166. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. 2005. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22 (3): 285-94.
167. Stockinger B, Omenetti S. 2017. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nature Reviews Immunology* AOP 30 May 2017.
168. Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, Sunshine MJ, Pierani A, Brenner-Morton S, Mebius RE, Littman DR. 2000. Requirement for ROR $\gamma$  in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 288(5475): 2369-73.
169. Suttmoller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation* 116(2): 485-94.
170. Tambillo L, Manchego S, Chiok KL, Sandoval N, More J, Rivera H. 2013. Evaluación in vitro de la respuesta leucocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 24(4): 510-523.
171. Taylor PR, Roy S, Leal SM Jr, Sun Y, Howell SJ, Cobb BA, Li X, Pearlman E. 2013. Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR $\gamma$ t and dectin-2. *Nature Immunology* AOP 22 Dec 2013.
172. Tizard I. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. 8va ed. España: Elsevier. 574 p.
173. Togni PD, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, Smith SC, Carlson R, Shornick LP, Strauss-Schoenberger J, Russel JH, Karr R, Chaplin DD. 1994. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264 (5159): 703-707.
174. Topliff CL, Smith DR, Clowser SL, Steffen DJ, Henningson JN, Brodersen BW, Bedenice D, Callan RJ, Reggiardo C, Kurth KL, Kelling CL. 2009. Prevalence of

- bovine viral diarrhea virus infection in US alpacas. *Journal of American Veterinary Medical Association* 234: 519-529.
175. Trajkovic V, Stosic-Grujicic S, Samardzic T, Markovic M, Miljkovic D, Ramic Z, Stojkovic MM. 2001. *J. Neuroimmunol.* 119 (2): 183-91.
  176. Tynes V. 2010. Behavior of exotic pets. 1<sup>st</sup> ed. UK: Wiley-Blackwell. 579 p.
  177. Ueda RH, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. 2002. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418: 534-539.
  178. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii JK, Akira S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunology* 9: 769-776.
  179. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S. 2007. Monocytes give rise to mucosal but not splenic, conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 204:171-180.
  180. Van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AM, Colin EM, Hazes JM, Dolhain RJ, Lubberts E. 2011. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum.* 63 (1): 73-83.
  181. Veldhoen M, Hocking JR, Atkins JC, Locksley MR, Stockinger B. 2006. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24 (2): 179-189.
  182. Villacorta C, López T, González A, Gómez L. 2009. Evaluación de *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas en Cusco. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 20 (2): 277-284.
  183. Von Burg N, Chappaz S, Baerenwaldt A, Horvath E, Bose Dasgupta S, Ashok D, Pieters J, Tacchini-Cottier F, Rolink A, Acha-Orbea H, Finke D. 2014. Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 (35): 12835-40.



184. Watanabe R, Manchego SA, Rivera GH. 2014. Expresión *in vitro* de las interleucinas 2 y 10 de linfocitos de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 25(3): 419-429.
185. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ. 2007. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282: 34605-34610.
186. Wentz PA, Belknap EB, Brock KV, Collins JK, Pugh DG. 2003. Evaluation of bovine viral diarrhea virus in New World camelids. *Journal of American Veterinary Medical Association* 223, 223-228.
187. Wernery U. 2001. Camelid immunoglobulins and their importance for the newborn: A review. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 48: 561-568.
188. Wernery U, Kaaden OR. 2002. Infectious diseases in camelids. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag. 403 p.
189. Whitehead CE. 2009. Management of neonatal llamas and alpacas. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25 (2): 353-366.
190. Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C. 1995. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 23: 327-333.
191. Wohlfert E, Belkaid Y. 2010. Plasticity of T reg at infected sites. *Mucosal Immunology* 3(3): 213-5.
192. Yaeger M, Yoon KJ, Schwartz K, Berkland L. 2004. West Nile virus meningoencephalitis in a Suri alpaca and Suffolk ewe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16(1): 64-6.
193. Yang Y, Torchinsky MB, Gobert M, Xiong H, Xu M, Linehan JL, Alonzo F, Ng C, Chen A, Lin X, Szczesnak A, Liao JJ, Torres VJ, Jenkins MK, Lafaille JJ, Littman DR. 2014. Focused specificity of intestinal Th17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature* 510 (7503): 152-6.
194. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155 (12): 5483-6.

195. Yoshida H, Honda K, Shinkura R, Nishikawa S. 1999. IL-7 receptor  $\alpha^+$  CD3 $^-$  cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int. Immunol.* 11: 643-655.
196. Yu X, Rollins D, Ruhn KA, Stubblefield JJ, Green CB, Kashiwada M, Rothman PB, Takahashi JS, Hooper LV. 2013. Th17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* 342 (6159): 727-30.
197. Zhang F, Meng G, Strober W. 2008. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR $\gamma$ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin-producing T cells. *Nature Immunology* 9 (11): 1297-1306.
198. Zhou L, Lopez JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov UP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. *Nature* 453 (7192): 236-240.
199. Zhu J, Paul EW. 2008. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood* 112: 1557-1569.
200. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2012. Pathogen-induced human Th17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 484 (7395): 514-8.
201. Zielinski CE. 2014. Autoimmunity beyond Th17: GM-CSF producing T cells. *Cell Cycle* 13: 2489-2490.

## IX. ANEXOS

**Cuadro A1.** Cuantificación de ARN total

A partir de ARN - utilizando cantidad de ARN similar - 20ul cDNA													
			Cálculo de volúmenes y cantidades similares para PCR										
Nro. Y	Edad	Concentración de ARN (ug/ul)	Nro. Y	Concentración de ARN (ug/ul)	Concentración de ARN (ug/ul)	Volumen (ul) requerido para colocar 1ug ARN en Rx	Agua en Rx RT (ul)	Cantidad de cDNA (ng) en 20ul de Rx	Concentración n final cDNA (ng/ul)	Concentración n cDNA (ug/ul) 1:5	Volumen (ul) requerido para colocar 20ng cDNA en PCR	Cantidad utilizada en PCR (ng)	Agua en Rx PCR (ul)
1	5	28 días	1	5	0.51	1.96	6.04	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
2	9	2 días	2	9	0.17	5.88	2.12	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
6	16	39 días	6	16	0.41	2.44	5.56	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
8	20	13 días	8	20	0.16	6.25	1.75	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
9	21	38 días	9	21	0.38	2.63	5.37	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
10	22	5 días	10	22	0.23	4.35	3.65	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
11	23	47 días	11	23	0.15	6.67	1.33	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
12	25	14 días	12	25	0.52	1.92	6.08	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
13	26	41 días	13	26	0.67	1.49	6.51	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
14	27	47 días	14	27	0.37	2.70	5.30	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
16	29	10 días	16	29	0.30	3.33	4.67	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
17	30	7 días	17	30	0.39	2.56	5.44	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
19	32	7 días	19	32	0.38	2.63	5.37	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
20	33	3 días	20	33	0.30	3.33	4.67	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
23	36	20 días	23	36	0.59	1.69	6.31	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
24	37	8 días	24	37	0.38	2.63	5.37	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
25	38	19 días	25	38	0.40	2.50	5.50	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
Calibradores													
Síntesis de cDNA - 1ug													
Síntesis de cDNA - 1ug													
Nro. Y	Edad	Concentración de ARN (ug/ul)	Nro. Y	Concentración de ARN (ug/ul)	Concentración de ARN (ug/ul)	Volumen (ul) requerido para colocar 1ug ARN en Rx	Agua en Rx RT (ul)	Cantidad de cDNA (ng) en 20ul de Rx	Concentración n final cDNA (ng/ul)	Concentración n cDNA (ug/ul) 1:5	Volumen (ul) requerido para colocar 20ng cDNA en Rx	Cantidad utilizada en PCR (ng)	Agua en Rx PCR (ul)
4y	01 día	0.41	4y	0.41	0.41	2.43	5.57	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00
45y	01 día	0.53	45y	0.53	0.53	1.88	6.12	1000.00	50.00	10.00	2.00	20.00	9.00

**Cuadro A2.** Resultados de la cuantificación relativa de ROR $\gamma$ t de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.

	EDAD	CT ROR $\gamma$ t	Tm	CT GAPDH	$\Delta\Delta Ct$	PROMEDIO	DS	CV
<b>Grupo Calibrador</b>	Neonato	24.54	83.51	16.70	1			
<b>GRUPO 1</b>	2 días	25.31	83.30	17.95	1.56	1.44	0.36	0.25
	3 días	24.72	83.60	17.33	1.54			
	5 días	25.72	83.37	17.45	0.83			
	7 días	25.00	83.37	17.85	1.81			
	7 días	25.35	83.60	17.90	1.47			
	8 días	26.66	83.08	19.38	1.65			
<b>GRUPO 2</b>	10 días	26.05	83.52	18.19	1.10	1.17	0.75	0.64
	13 días	28.04	83.45	17.72	0.20			
	14 días	26.14	83.08	18.19	1.04			
	19 días	27.11	83.60	18.57	0.69			
	20 días	25.39	83.45	18.62	2.36			
<b>GRUPO 3</b>	26 días	25.28	83.30	16.27	0.50	1.41	1.22	0.86
	38 días	26.50	83.45	19.61	2.16			
	39 días	28.29	83.00	17.92	0.19			
	41 días	26.99	83.45	18.62	0.78			
	47 días	25.16	83.30	17.62	1.37			
	47 días	25.59	83.60	19.37	3.44			

DS: Desviación estándar

CV: Coeficiente variación.

**Cuadro A3.** Resultados de la cuantificación relativa de IL-17 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.

Muestra	Edad	CT IL17	Tm	CT GAPDH	$2^{-(C_t - C_t)}$	Promedio	DS	CV
<b>GRUPO CALIBRADOR</b>	Neonato	35.51	76.82	16.7	1			
<b>GRUPO 1</b>	2 días	31.62	84.46	17.95	35.45	14.84	13.72	0.92
	3 días	34.17	77.90	17.33	0.67			
	5 días	34.17	84.53	17.45	4.28			
	7 días	32.19	84.53	17.85	22.26			
	7 días	33.66	84.76	17.90	8.29			
	8 días	31.26	84.38	18.19	122.74			
<b>GRUPO 2</b>	10 días	31.55	84.61	18.19	43.62	35.88	22.18	0.62
	13 días	30.48	84.61	17.72	66.46			
	14 días	33.59	84.24	18.59	10.62			
	19 días	32.71	84.38	18.57	25.52			
	20 días	33.84	77.97	18.62	12.10			
<b>GRUPO 3</b>	26 días	33.41	84.38	19.61	3.74	128.81	142.20	1.10
	38 días	33.58	84.61	19.61	28.69			
	39 días	30.85	84.16	17.92	59.22			
	41 días	32.13	84.53	18.62	39.57			
	47 días	28.45	84.46	17.62	252.98			
	47 días	29.69	84.61	19.37	360.17			

DS: Desviación estándar.

CV: Coeficiente variación.

```

. swilk *ΔΔCt

      Shapiro-Wilk W test for normal data

```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
*ΔΔCt	17	0.94988	1.143	0.267	0.39164

```

. oneway *ΔΔCt GrupoEtario, bonferroni

```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.24686881	2	.123434405	0.16	0.8531
Within groups	10.751769	14	.767983498		
Total	10.9986378	16	.687414861		

```

Bartlett's test for equal variances:  chi2(2) = 4.8157 Prob>chi2 = 0.090

```

Comparison of 2\*(\*ΔΔCt) by Grupo Etario  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2
1	-.269208 1.000	
2	-.034243 1.000	.234952 1.000

**Figura A3.** Resultados software STATA 14: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para RORyt en los diferentes grupos etarios.

```

chi-squared with ties = 4.654 with 2 d.f.
probability = 0.0976

```

```

. swilk *ΔΔCt

      Shapiro-Wilk W test for normal data

```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
*ΔΔCt	17	0.64570	7.485	4.014	0.00003

```

. kwallis *ΔΔCt, by(GrupeEtario)

```

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

GrupoE~o	Obs	Rank Sum
1	5	25.00
2	6	60.00
3	6	68.00

```

chi-squared = 4.654 with 2 d.f.
probability = 0.0976

```

```

chi-squared with ties = 4.654 with 2 d.f.
probability = 0.0976

```

```
. ranksum ^ $\Delta\Delta$ Ct, by(GrupoEtario)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

GrupoEtario	obs	rank sum	expected
1	5	20	30
2	6	46	36
combined	11	66	66

unadjusted variance            30.00

adjustment for ties            0.00

---

adjusted variance            30.00

Ho: ^ $\Delta\Delta$ Ct(GrupoE~o==1) = ^ $\Delta\Delta$ Ct(GrupoE~o==2)

z = -1.826

Prob > |z| = 0.0679

.

```
. di 0.0679*3
```

```
.2037
```

```
. ranksum ^ $\Delta\Delta$ Ct, by(GrupoEtario)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

GrupoEtario	obs	rank sum	expected
2	6	35	39
3	6	43	39
combined	12	78	78

unadjusted variance                      39.00

adjustment for ties                      0.00

---

adjusted variance                      39.00

Ho: ^ $\Delta\Delta$ Ct(GrupoE~o==2) = ^ $\Delta\Delta$ Ct(GrupoE~o==3)

z = -0.641

Prob > |z| = 0.5218

```
. di 0.5218*3
```

1.5654



```

. ranksum ^ΔΔCt, by(GrupoEtario)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test


```

GrupoEtario	obs	rank sum	expected
1	5	20	30
3	6	46	36
combined	11	66	66

```

unadjusted variance      30.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance        30.00

Ho: ^ΔΔCt(GrupoE~o==1) = ^ΔΔCt(GrupoE~o==3)
      z =  -1.826
      Prob > |z| =  0.0679

.
. di 0.0679*3
.2037

```

**Figura A5.** Resultados software STATA 14: Prueba de Shapiro wilk, Kruskal Wallis y U-Mann Whitney para IL-17 en los diferentes grupos etarios.